

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ALTÉRATION DE L'ACTIVITÉ PHOTOCHIMIQUE DE LA PHOTOSYNTHÈSE
AINSI QUE LA SENSIBILITÉ AUX EFFETS TOXICIQUES DE
XÉNOBIOTIQUES DURANT LE CYCLE CELLULAIRE CHEZ
CHLAMYDOMONAS REINHARDTII

THÈSE
PRÉSENTÉE
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

PAR
OLIVIER DIDUR

MAI 2014

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier les membres du jury qui ont acceptés d'évaluer ce travail de thèse.

Je remercie également le Dr. Radovan Popovic qui a dirigé ma thèse de doctorat. Merci pour son temps, ses conseils et tout le support apporté durant mon doctorat et l'écriture de ma thèse. De m'avoir poussé à sortir du moule et de voir l'ensemble de la recherche et non pas juste les petits détails. Je tiens aussi à remercier Dr David Dewez et le Dr Abdallah Oukarroum pour avoir contribué grandement à l'avancement de mes articles mon travail.

Merci à tous mes collègues de laboratoire qui ont participé plus ou moins directement à mes travaux de recherche pendant des expériences diverses mais particulièrement François Perreault pour son support dans les dernier mois qui m'a permis finalement de finir...

Enfin, mes remerciements vont à mes parents et ma copine Claudy Beaulieu qui m'ont soutenue tout au long de mes études et des long mois passés devant ma thèse. Merci pour vos encouragements et support qui m'ont permis d'accomplir la tâche que d'achever mon doctorat

AVANT-PROPOS

Les résultats de mes recherches effectuées, durant mon doctorat, m'ont permis de soumettre trois articles scientifiques dans des journaux internationaux. Ma contribution scientifique à ces articles, dans lesquels je figure comme premier auteur, provenant de mon projet est majeure. Cette thèse est ainsi présentée sous forme de compilation de ces trois articles qui seront présentés dans les chapitres III, IV et V

- Chapitre III : Olivier Didur, François Perreault, Abdallah Oukarroum, David Dewez, Radovan Popovic «Change of Photosystem II activity of *Chlamydomonas reinhardtii* in synchronized and asynchronized cell cycle culture». Photosynthesis research (soumis 2011). Dans ce travail, j'ai élaboré le projet et effectué les expériences de laboratoire. L'étudiant François Perreault a contribué à l'interprétation des résultats. J'ai contribué à l'interprétation des résultats et j'ai écrit la première version de l'article.
- Chapitre IV: Olivier Didur, David Dewez, Radovan Popovic « Alteration of chromium effect on photosystem II activity in *Chlamydomonas reinhardtii* cultures under different synchronized state of the cell cycle.». Environmental Science and Pollution Research (Publié en 2013). Dans cet article, j'ai élaboré le projet et effectué les expériences de laboratoire. L'étudiant François Perreault a contribué à l'interprétation des résultats. J'ai contribué à l'interprétation des résultats et à écrire la première version de l'article.

- Chapitre V : Olivier Didur, François Perreault, Abdallah Oukarroum, David Dewez, Radovan Popovic « Alteration of Photosystem II Activity by Atrazine Toxicity Effect on *Chlamydomonas reinhardtii* Synchronized and Asynchronized Cell Cycle Cultures ». Toxicology and Environmental Chemistry (Publié Mai 2012). Dans cet article, j'ai élaboré le projet et effectué les expériences de laboratoire. L'étudiant François Perreault a contribué aux expériences de laboratoire et à l'interprétation des résultats. J'ai contribué à l'interprétation des résultats et à la rédaction de la première version de l'article.

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS.....	iv
Liste des figures	ix
Liste des tableaux.....	xiv
Liste des abréviations.....	xv
RÉSUMÉ	xix
Introduction générale	1
CHAPITRE I.....	7
LA PHYSIOLOGIE CELLULAIRE VÉGÉTALE.....	7
1.1 L'activité photosynthétique	7
1.2 Organisation cellulaire	8
1.3 La structure du photosystème II.....	12
1.3.1 Le complexe collecteur du photosystème II.....	12
1.3.2 Le centre réactionnel du photosystème II	15
1.3.3 Le complexe de dégagement d'oxygène (CDO).....	16
1.4 Aspects fonctionnels du photosystème II.....	18
1.4.1 Dissipation d'énergie au niveau du photosystème II	22
1.4.2 La séparation de charges et la photolyse de l'eau	23
1.4.3 Le transport transmembranaire des électrons.....	27
1.5 Structure et fonctionnement du photosystème I.....	31
1.5.1 Les antennes collectrices de lumière du photosystème I	31
1.5.2 Le centre réactionnel du photosystème I (CRI)	32
1.5.3 Fonctionnement du photosystème I	34
1.6 La photophosphorylation liée à la formation du gradient de protons dans le lumen	35
1.7 La régulation du transport transmembranaire des électrons	38
1.7.1 Dissipation d'énergie sous forme de chaleur	38
1.8 Distribution de l'énergie entre les deux photosystèmes	42
1.9 Le rendement et la cinétique de la fluorescence chlorophyllienne des photosystèmes.....	44
1.9.1 Principe de la cinétique rapide et polyphasique de la fluorescence	

chlorophyllienne.....	47
1.9.1.1 Les paramètres photosynthétiques évalués à partir du rendement et de la cinétique rapide de fluorescence	50
1.9.2 Principe de la cinétique lente de la fluorescence chlorophyllienne	51
1.9.2.1 Les paramètres photosynthétiques évalués à partir de la cinétique de fluorescence à l'état stationnaire.	54
1.10 La chimie des espèces réactives de l'oxygène.....	56
1.10.1 La chimie des espèces réactives de l'oxygène.....	57
1.11 La fixation du CO ₂ et la synthèse de glucides.....	60
1.12 Le cycle cellulaire	61
1.12.1 Les étapes du cycle cellulaire.....	63
1.12.2 Transition des phases du cycle cellulaire	65
CHAPITRE II	68
PROJET DE RECHERCHE : Altération de la sensibilité aux effets de xénobiotiques ainsi que de l'activité photochimique de la photosynthèse durant le cycle cellulaire.....	68
2.1 Les problématiques spécifiques et les objectifs de recherche réalisés.....	68
CHAPITRE III	72
Change of Photosystem II activity of <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> in synchronized and asynchronized cell cycle culture	72
3.1 Résumé.....	73
3.2 Abstract	74
3.3 Introduction.....	755
3.4 Materials and methods	788
3.4.1 Algal culture.....	788
3.4.2 Cell growth and chlorophyll determination	788
3.4.3 Flow Cytometry Analysis.....	78
3.4.4 Determination of chlorophyll <i>a</i> fluorescence parameters	79
3.4.5 Data analysis and statistic	80
3.5 Results and Discussion.....	80
3.6 References.....	84
CHAPITRE IV	95
The effect of chromium on photosystem II activity in <i>Chlamydomonas</i>	

<i>reinhardtii</i> cells in synchronous and asynchronous cultures.....	95
4.1 Résumé.....	96
4.2 Abstract	97
4.3 Introduction.....	98
4.4 Materials and methods.	101
4.4.1 Algal culture	101
4.4.2 Flow Cytometry Analysis.....	102
4.4.3 Determination of chlorophyll <i>a</i> fluorescence parameters	102
4.4.4 Data analysis and statistic	103
4.5 Results and Discussion.....	104
4.6 Acknowledgements	108
4.7 References.	109
CHAPITRE V	117
Alteration of Photosystem II Activity by Atrazine Toxicity Effect on <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Synchronized and Asynchronized Cell Cycle Cultures	117
5.1 Résumé.....	118
5.2 Abstract	119
5.3 Introduction.....	120
5.4 Materials and methods	123
5.4.1 Algal culture	123
5.4.2 Atrazine treatments	123
5.4.3 Cell growth and chlorophyll determination	123
5.4.4 Flow Cytometry Analysis.....	124
5.4.5 Determination of chlorophyll <i>a</i> fluorescence parameters	124
5.4.6 Data analysis and statistic	126
5.5 Results and Discussion.....	127
5.6 Acknowledgments	131
5.7 References	132
Conclusion	143
Autres contributions.....	148
Référence.....	150

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1: A : Schémas de la structure et de l'agencement interne d'un chloroplaste chez les algues. (Selon Horton 1994) B: Structure schématique d'un thylacoïde (d'après Malkin et Niyogi, 2000)	9
2: Représentation schématisé des transporteurs d'électrons dans la membrane du thylacoïde. Les complexes membranaires sont les photosystèmes II et I, le cytochrome b6f, la plastocyanine et l'ATP synthétase.	11
3: Modèle structurel du PSII montrant les deux protéines D1 et D2, le complexe de photolyse de l'eau (constitué de 3 protéines de poids moléculaire 33, 24 et 17 kDa), les protéines constituant l'antenne collectrice de lumière (LHCII, CP24, CP26 et CP29) et les protéines liant la chlorophylle <i>a</i> : la CP43 et CP47 (d'après Szabo et al., 2005).....	14
4: Structure du PSII chez les algues, il est formé d'une partie intrinsèque (formé par CP47, CP43, D1 et D2) et d'une partie extrinsèque responsable du dégagement d'oxygène (formé par 33, 24, 17 et 10kDa codé par Psb O, U, Q et R) (d'après Roose et al. 2007).....	17
5: Structure moléculaire de la chlorophylle <i>a</i> et <i>b</i>	18
6: Spectre d'absorption des chlorophylles <i>a</i> et <i>b</i> chez les plantes supérieures (d'après Raven et al. 2000).....	19
7: Les niveaux d'énergie dans une molécule de chlorophylle et les mécanismes de dissipation de son énergie absorbée (d'après Buchanan et al. 2000).	20
8: Transfert d'un photon absorbé d'un pigment photosynthétique a un autre de façon aléatoire vers le P680 (d'après Raven et al. 2000 ; Jupin et Lamant. 1999)	21
9: Voies de dissipation d'énergie de la chlorophylle excitée du PSII (d'après Müller et al. 2001).....	22
10: Dégagement de l'oxygène suite à des éclaires saturantes (d'après Joliot et	

al. 1969)	25
11: Schéma de la formation des états «S» et la production de protons dans le lumen durant la photo-oxydation de l'eau et le dégagement d'O ₂ (d'après Buchanan, 2000)	26
12: Représentation schématique de la chaîne de transport de l'électron par oxydoréduction de P680 vers entre les quinones A (Q _A), B (Q _B) et plastoquinone (PQ) (d'après Whitmarsh et Govindjee, 2002).....	28
13 : Schéma en Z résumant les réactions de transfert d'électrons photosynthétique selon leur potentiel d'oxydoréduction. Le P680 et P700 sont les centres réactionnels du PSII et du PSI. La réduction du P680* et P700* provient de l'absorption de l'énergie lumineuse (hv). Les PQ, Cyt et PC sont les accepteurs d'électrons du PSII. NADP-réductase qui réduit le NADP ⁺ en NADPH situé à la fin de la chaîne de transport d'électron (d'après Whitmarsh, 1998).....	29
14: Schéma de l'organisation structurelle du PSI et de ses différentes composantes protéiques (indiquées par les lettres ; Malkin et Niyogi, 2000 ; les abréviations sont explicitées p. 12).	33
15: PC transporte les électrons vers le PSI. A0, A1, Fx, Fa/FB et FD sont les accepteurs d'électrons du PSI. NADPF est l'enzyme ferrédoxine NADP-réductase qui réduit le NADP ⁺ en NADPH (d'après Whitmarsh, 1998).	34
16: Modèle structurel d'un thylacoïde (d'après Lehninger et al. 1994) montrant le couplage "chimio-osmotique" entre le transport membranaire des électrons et la formation du gradient de protons transmembranaire permettant la synthèse de l'ATP (d'après Heller et al. 1998)	36
17: Modèle de la structure du complexe ATP synthétase. Le CF1 se compose des cinq sous-unités polypeptidiques α , β , γ , δ , ϵ . Le CF0 est constitué des sous-unités I, II et III (d'après Mallkin et Niyogi, 2000).	37
18: Cycle des xanthophylles lors de la régulation de la dissipation d'énergie lumineuse (d'après Müller et al. 2001).....	40
19: Changement structurel et fonctionnel du PSII suite à une augmentation excessive de proton dans le lumen et du transport cyclique d'électrons suite à une exposition à des intensités lumineuses excessives (schéma élaboré à partir de Critchley, 1998).....	41
20: Schéma de la régulation des changements d'état I et II par l'induction de	

la phosphorylation des LHCII (Jupin et Lamant, 1999). Les rectangles achurés indiquent laproportion des LHCII mobiles.....	43
21: Modèle de l'émission de la fluorescence chlorophyllienne du photosystème II (schéma élaboré à partir de Lazár, 1999, 2006).	46
22: Cinétique rapide de fluorescence chlorophyllienne montrant les transitions O-J-I-P, mesurée sur une échelle de temps logarithmique. Les transitions O, J, I et P apparaissent respectivement à 50 μ s, 2 ms, 30 ms et approximativement à 300 ms. QA et QB sont les accepteurs primaires et secondaires du PSII; PQH ₂ est la plastoquinone à l'état réduite (D'après Strasser et al. 1995).....	49
23 : Modèle de la membrane thylacoïdale indiquant les différents paramètres photosynthétiques qui caractérisent le fonctionnement du PSII .ABS/RC pour le LHCII, TR0/RC utilisée pour la séparation de charge , ET0/RC pour le transport d'électrons ou DI0/RC pour la dissipation d'énergie sous forme de chaleur (d'après Zrýd et al., 2002).....	51
24: Cinétique de fluorescence modulée mesurée par la méthode PAM (schéma élaboré à partir de Schreiber et al. 1986). F _O et F' _O : fluorescence de base pour une plante adaptée à l'obscurité ou à la lumière, F _V : fluorescence variable; F _M et F _M ': fluorescence maximale pour une plante adaptée à l'obscurité ou à la lumière, Q _N , «quenching» non photochimique; Q _P , «quenching» photochimique.	52
25: Sites de formation d'ERO pendant la photosynthèse et le transport des électrons entre le PSII et PSI (d'après Asada, 1994; McKersie et Leshem, 1994).	59
26: Les réactions biochimiques de la fixation du CO ₂ lors du cycle de Calvin (d'après Heineke, 2001).	61
27: Structure d'un chromosome, formée de 2 chromatides sœurs et liée par le centromère.....	62
28: Schématisation des diverses phases du cycle cellulaire.....	64
3.1 : The cell cycle is composed of four phases: G ₁ , S, G ₂ and M.	87
3.2: Ratio of the cell population (10,000 cells) under the different cell cycle phases (G ₀ /G ₁ , S and G ₂ /M) for algal cells grown under a light regime of 16h light and 8h of darkness (a) and under continuous illumination (b).	

The shaded background of the top figure represents the darkness period.	88
3.3: Ratio of the cell population under a light regime of 16 hours light and 8 hours of darkness (in gray). Cells were culture for three weeks under a light/dark regime of 16h/8h ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and divided every three days to maintain exponent ion growth. The G_1 phase (gray) around 45% when the light turn then increase around 85% after an illumination period of 9 hours to slowing decrease back to the small level at the end of the dark period. The S phase (white) increase rapidly after an illumination period of 6 hours and stay steady for the next 15 hours leaving time for the cell to complete it DNA replication. The G_2/M phase (cross line) is at it highest level when the light turn on, then decrease rapidly over the next 6 hours to be back at the same level after an exposition of 8 hours in darkness (error bars were remove to simplify graphic since they varie around 2-3% of each point).	89
3.4: Ration of the cell population under continuous light regime. The algae were culture for three weeks under continuous light regime ($100\mu \text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), divided every three days to maintain the exponential growth. The G_1 phase under continuous light (gray) stay around 90% all day long. The S phase (white) stay steady around 5% as the G_2/M phase (cross line). (error bars were remove to simplify graphic since they varie around 2-3% of each point).	90
3.5: The algae were culture for three weeks under continuous light or light/dark regime ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), divided every three days to maintain the exponential growth The principal photosynthetic parameters measure with the PEA every 3 hours during light cycle or continuous light (error bars were remove to simplify graphic since they varie around 2-3% of each point).....	91
3.6: Chlorophyll synthesis during the light/dark regime. The algae were culture for three weeks under light/dark regime ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), divided every three days to maintain the exponential growth. One millilitres of the cell culture was taken to by counter by Multisizer 3 Coulter Counter and the chlorophyll content was analyzed using the protocol explained earlier.....	92
3.7: Carotenoids synthesis during the light/dark regime. The algae were culture for three weeks under light or light/dark regime ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), divided every three days to maintain the exponential growth. One millilitres of the cell culture was taken to by counter by Multisizer 3 Coulter Counter and the pigment content was analysing using the	

protocol explained earlier.....	93
4.1: Figure 1: Ratio of the cell population (10,000 cells) under the different cell cycle phases (G_0/G_1 , S and G_2/M) for algal cells grown under a light regime of 16h light and 8h of darkness (a) and under continuous illumination (b). The shaded background of the top figure represents the darkness period.	113
4.2: Change of PSII maximum quantum yield Φ_{MII} (a) and PSII operational quantum yield Φ'_{MII} (b) when algal cells grown under different light regimes were exposed to Cr.	114
5.1: Left : Distribution of algal cell population in the G_0/G_1 , S and G_2/M phases of the cell cycle for different light regimes. L/D $t=0$ and L/D $t=6$ indicate cells grown in a light/dark cycle before the onset of illumination ($t=0$) or after 6h of illumination ($t=6$). Right: Flow cytometry separation of the cell population using the DNA binding fluorescent sensor SYBR Green (see section 2.4 for more details).	138
5.2: Rapid Chl <i>a</i> fluorescence rise in <i>C. reinhardtii</i> cultures exposed to 100 μ M atrazine for 24h. Cultures exposed to atrazine were either grown in continuous light (Atz-Cont) or in the light/dark cycle and exposed at the onset of illumination (Atz-L/D $t=0$) and after 6h of illumination (Atz-L/D $t=6$). The control sample (Ctrl) is presented for the continuous light culture (Ctrl-Cont) and the L/D cycle cultures (Ctrl-L/D).	139
5.3: Change of the PSII energy fluxes parameters obtained from the rapid Chl <i>a</i> fluorescence rise of <i>C. reinhardtii</i> cultures exposed 24h to atrazine. Cultures exposed to atrazine were either grown in continuous light (Atz-Cont) or in the light dark cycle and exposed the onset of illumination (L/D $t=0$) or after 6h of illumination (L/D $t=6$) (see section 2.5 for details on parameters).....	140
5.4: Change of the PSII energy fluxes parameters obtained from the rapid Chl <i>a</i> fluorescence rise of <i>C. reinhardtii</i> cultures exposed 24h to atrazine. Cultures exposed to atrazine were either grown in continuous light (Atz-Cont) or in the light dark cycle and exposed the onset of illumination (L/D $t=0$) or after 6h of illumination (L/D $t=6$) (see section 2.5 for details on parameters).....	141

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1: Nomenclature des différentes formes des espèces réactives de l'oxygène (Dat et al. 2000, McKersie et Leshem, 1994).	65
2: Distribution of the different Cr species (% of total Cr) in the HSM medium for the different Cr concentrations used. Cr speciation was calculated with the Visual MINTEQ 3.0 chemical equilibrium software.	115

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABS/RC	« <i>Absorption flux per reaction center</i> »
ADP	Adénosine diphosphate
ATP	Adénosine triphosphate
CDO	Complexe de dégagement d'oxygène
Chl	Chlorophylle
Chl <i>a</i>	Chlorophylle <i>a</i>
Chl <i>b</i>	Chlorophylle <i>b</i>
¹ Chl, ³ Chl, *Chl	Chlorophylle à l'état singulet, triplet et excité
CO ₂	Dioxyde de carbone
CR	Centre réactionnel du photosystème
Cyt b ₆ f	Cytochrome b ₆ f
DI ₀ /RC	« <i>Non photochemical energy dissipation per reaction center</i> »
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
ET ₀ /RC	« <i>Electron transport flux per reaction center</i> »
F	Fluorescence variable induite par une illumination actinique continue
F _M	Fluorescence maximale induite par un flash saturant après adaptation à l'obscurité
F' _M	Fluorescence maximale induite par un flash saturant sous illumination actinique continue

F ₀	Fluorescence de base obtenue par une lumière analytique modulée après adaptation à l'obscurité
F' ₀	Fluorescence de base obtenue par une lumière analytique modulée après illumination dans le rouge lointain (735 nm)
F _{50μs}	Intensité de fluorescence à 50 μs
FNR	Ferrédoxine NADP-réductase (ferrédoxine : NADP ⁺ oxydoréductase)
F _v	Fluorescence variable
kDa	Kilodalton
LHCI et LHCII	Complexe collecteur de lumière (<i>Light Harvesting Complexes</i>) du PSI et du PSII
LM	Lumière modulée
LS	Lumière saturante
NADP, NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme oxydée, sous forme réduite
O-K-J-I-P	Transitions de la cinétique rapide de fluorescence chlorophyllienne
PAM	« <i>Pulse Amplitude Modulation</i> »
PC	Plastocyanine
PEA	« <i>Plant efficiency Analyzer</i> »
Phéo	Phéophytine
Pi	Phosphate inorganique

PQ	Plastoquinone
PQH ₂	Plastoquinol
PSI	Photosystème I
PSII	Photosystème II
P680	Centre réactionnel du PSII
P700	Centre réactionnel du PSI
Q _A	Quinone A, accepteur primaire d'électron du PSII
Q _B	Quinone B, accepteur secondaire d'électron du PSII
Q _E	Composant du « <i>quenching</i> » non-photochimique dépendant de la formation d'un gradient de protons transmembranaire
Q _I	Composant du « <i>quenching</i> » non-photochimique dépendant des photodommages au niveau du PSII causés par la photoinhibition
Q _N	« <i>quenching</i> » non-photochimique
Q _P	« <i>quenching</i> » photochimique
Q _T	Composant du « <i>quenching</i> » non photochimique dépendant des états de transitions
RL	Lumière dans le rouge lointain (735 nm)
RUBISCO	Ribulose biphosphate carboxylate (3-phospho-D-glycérate carboxylase)
Tyr _Z	Résidu tyrosine de la protéine D1
Y _Z	Donneur secondaire d'électrons du PSII

ϕ_M

Efficacité photochimique maximale du PSII pour une plante adaptée à l'obscurité

 ϕ'_M

Efficacité photochimique opérationnelle du PSII à l'état stationnaire du transport d'électrons pour une plante adaptée à une illumination actinique continue

RÉSUMÉ

Cette thèse a eu comme projet de recherche d'investiguer les altérations de l'activité photochimique de la photosynthèse et de la sensibilité face aux effets toxiques des xénobiotiques durant le cycle cellulaire chez *Chlamydomonas reinhardtii*. Dans un premier temps, l'identification des diverses phases du cycle cellulaire a été réalisée grâce au contenu en ADN de chaque algue. Suite à l'utilisation de cycle d'illumination, il a été possible de synchroniser et de séparer les diverses phases du cycle afin d'évaluer leur photochimie. Cette séparation a permis l'analyse de la fluorescence chlorophyllienne et l'étude des variations du rendement photochimique du PSII durant les diverses étapes du cycle cellulaire. Les différents paramètres de fluorescence chlorophyllienne suivant ont été utilisés : la taille des antennes, la capture de photons et de la chaîne de transport d'électron par centre réactionnel actif du photosystème II. Ces indicateurs ont permis d'observer la variabilité de l'appareil photosynthétique durant les différentes phases du cycle cellulaire. Nos résultats nous ont permis de constater que les algues en croissance exponentielle sous un cycle d'illumination continue ne présentaient qu'une variation très faible du rendement photochimique. L'exposition à des cycles d'illuminations de 16h de lumière et de 8h de noirceur, a révélé des variations de l'ordre d'environ 20% sur les divers paramètres photosynthétiques entre les diverses phases du cycle cellulaire.

Dans un deuxième temps, il a été pertinent durant ce projet de thèse d'étudier l'impact du cycle cellulaire (à l'aide de cultures d'algues synchronisées et asynchronisées) sur la sensibilité face aux effets toxiques du chrome hexavalent, suite à une exposition de 24h. Les cultures d'algues ont été traitées durant les diverses phases du cycle cellulaire à des concentrations variant de 0 à 50µM. L'étude du rendement quantique maximal et opérationnel du photosystème II a permis d'évaluer l'altération de la sensibilité en présence de chrome durant le cycle cellulaire. Les algues exposées en stade Pphase de croissance 2 et/ou mitose (G₂/M)

étaient nettement plus sensibles que celles exposées en stade de croissance latente et/ou phase de croissance 1 (G_0/G_1). De plus, la comparaison des algues sous des cycles d'illuminations et sous une lumière continue a permis d'observer que les algues croissantes sous un cycle lumière/noirceur en stade G_0/G_1 étaient plus sensibles à la présence de chrome que celles poussant sous une lumière continue.

Finalement, l'impact du cycle cellulaire sur la sensibilité aux effets toxiques de l'atrazine a été mesuré durant ce projet de recherche. La toxicité de l'atrazine s'explique par sa liaison avec la quinone B (Q_B), causant une inhibition de l'oxydation de la quinone A (Q_A) et une inhibition de la chaîne de transport des électrons. L'analyse de la fluorescence chlorophyllienne par la méthode de «*Plant efficiency Analyzer*» (PEA) et «*Pulse Amplitude Modulation*» (PAM) a permis d'évaluer le rendement photochimique du PSII. La présence d'atrazine a entraîné une inhibition de la chaîne de transport des électrons et une augmentation de la dissipation d'énergie sous forme de chaleur. Cette inhibition était nettement accrue en présence chez les algues en cycle d'illumination comparativement à celles en lumière continue. De plus, les algues exposées durant le stade G_0/G_1 se sont révélées plus sensibles que celles en stade G_2/M .

Il a donc été possible de conclure durant ce projet de recherche que les diverses phases du cycle cellulaire peuvent entraîner des altérations notables sur le fonctionnement de la photosynthèse. La présence des phases du cycle lors de la synchronisation des cultures d'algues pourrait expliquer la variabilité des résultats de la photosynthèse obtenus dans diverses études. La présence du cycle cellulaire entraîne des modifications importantes de la toxicité des divers xénobiotiques. Il est possible alors de croire que l'utilisation de culture d'algues en illumination constante entraînerait un biais dans les résultats des bioessais algaux en sous-estimant la toxicité réelle de ces produits. Cette sous-estimation constante pourrait avoir des effets néfastes sur l'environnement sur la communauté d'algues dans un écosystème

ainsi que sur la chaîne trophique.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

L'accroissement de l'activité humaine depuis le début du XX^e siècle a engendré le déversement de grande quantité de matières polluantes dans l'environnement. L'être humain a finalement prit conscience que ces activités entraîne de lourds impact sur son habitat. La pollution est une problématique qui prend de plus en plus d'importance au sein de la société moderne.

Depuis la révolution industrielle, l'être humain pollue son environnement à un rythme alarmant et a entraînée la dispersion de quantités considérables de xénobiotiques nocifs. La présence de ces substances entraîne des conséquences désastreuses sur les divers constituants de la chaîne trophique et peut même causer des problèmes de santé chez l'être humaine. De nombreuses études ont été réalisées dans les 30 dernières années dans le but comprendre la provenance de la pollution et son effet sur les divers écosystèmes dans l'environnement. Ces études ont démontré que l'accumulation dans les écosystèmes, sur une longue période, de polluants entraîne une détérioration marquée de la qualité de l'environnement (Gérin *et al.* 2003 ; Wahid, 2006). Ce déclin environnementales va entraîner des modifications des chaînes trophiques des cours d'eau, des forêts ainsi qu'une diminution de la production agricole (Chapelka et Samuelson, 1998; Wahid, 2006).

Les principales sources de pollutions environnementales se résument sous trois domaines soit : l'activité domestique, l'activité industrielle et la combustion d'hydrocarbure. L'activité domestique et ménagère est la cause de la libération de grande quantité de phosphate et de nitrate dans les cours d'eau. Actuellement, l'agriculture utilise de très grande quantité d'engrais (phosphate et de nitrate) qui se retrouve très souvent dans les cours d'eau et polluent les nappes phréatiques, les lacs et les rivières (Ju et al. 2007, Singh et al. 2007). L'utilisation d'herbicides et des pesticides en agriculture, libèrent de nombreux résidus toxiques qui se retrouvent

par la suite en contact avec les organismes aquatiques (Thompson *et al.* 2006). La croissance du phytoplancton est contrôlée par la concentration d'élément limitant tel que la concentration de nitrate, de phosphate et parfois la silice dissoute dans l'eau (Fauchot *et al.* 2005 et Parkhill *et al.* 1999). L'augmentation de la biodisponibilité de ces nutriments occasionne une prolifération du phytoplancton et des végétaux aquatiques. Cette prolifération accrue et parfois exponentielle de végétaux dans un écosystème peut entraîner un phénomène d'eutrophisation suite à la consommation de la presque totalité de l'oxygène dissous dans l'eau. Des études ont d'ailleurs suite à de forte précipitation sur le continent, une augmentation massive de nutriments dans les cours d'eau est détectée due aux eaux de ruissellement. Cette augmentation de nutriment est directement liée au niveau de l'activité humaine de la région (Weise *et al.* 2002, Van Dolah *et al.* 2009; Garcia-Pintado *et al.* 2007).

Les industries (métallurgiques et minières) ainsi que la combustion des moteurs sont à l'origine de la pollution des écosystèmes par les métaux lourds (comme le cadmium, le chrome, et le mercure) et les hydrocarbures (Guo *et al.* 2007 ; Sprovieri *et al.* 2007). L'accumulation de la pollution métallique dans l'environnement s'explique puisque celle-ci n'est pas biodégradable comparativement à celle de type organique. Une fois dans un écosystème, ces métaux subissent des modifications de type oxydo-réduction et peuvent former des complexes avec la matière organique. La formation de complexes métaux-matière organiques modifie la biodisponibilité et facilite dans bien des cas l'ingestion de ces métaux par la flore aquatique (Wade *et al.* 1993). L'injection de ces métaux lourds est toxique chez la plupart des organismes aquatiques et peut entraîner une bio-accumulation dans la chaîne trophique.

Depuis les trente dernières années, on remarque une augmentation du nombre d'études sur la qualité de l'environnement. Ces études sont axées principalement sur la détection et les effets des xénobiotiques nocifs dispersés dans l'environnement. Dans les écosystèmes aquatiques, les plantes et les algues sont souvent les premiers

organismes susceptibles d'être affectés par la présence de xénobiotiques. Ces organismes, à la base de la chaîne trophique, utilisent l'énergie solaire pour la transformer en énergie chimique. Ils sont d'une importance essentielle pour les organismes trophiques supérieurs. Une modification de la biodiversité et de la communauté des ces micro-organismes peut entraîner de lourdes conséquences pour un écosystème.

L'importance de la surveillance de la qualité des divers écosystèmes a permis le développement de bio-essais. Ces bio-essais ont pour but d'assurer la qualité de l'eau et dans certains cas de mettre en évidence la présence et la nature des contaminants. Ces bio-essais sont basés sur l'altération du taux de croissance et de développement des algues (altération physiologique) dans le but d'évaluer la toxicité d'une substance ou de la qualité d'un environnement. La diminution de la biomasse chez les organismes photosynthétiques est souvent liée à une inhibition de la photosynthèse due aux effets toxiques des xénobiotiques.

La photosynthèse est le processus de base chez les végétaux. Elle est responsable de l'état physiologique, de la croissance de la biomasse ainsi qu'une partie du métabolisme interne. La photochimie est la transformation de l'énergie lumineuse en énergie chimique grâce à de pigments chlorophylliens fonctionnant comme capteurs de lumière. Les modifications du processus de la photochimie suite à une exposition de xénobiotiques nous renseignent sur les divers mécanismes de toxicité d'un produit et de son impact possible sur l'environnement. La majorité de ces polluants affectent la photosynthèse selon deux voies : (1) l'inhibition directe, par l'inhibition de la photochimie primaire ou du transport des électrons vers les photosystèmes, (2) l'inhibition indirecte, par l'altération des processus métaboliques liés à la photosynthèse soit : la photorespiration, synthèse lipidique et des protéines ainsi que l'inhibition de la synthèse de la chlorophylle et des autres pigments essentiels à la captation de la lumière. Ces modifications de l'efficacité

photosynthétique induisent une diminution de la croissance et du développement des organismes photo-autotrophes.

La mesure et l'analyse de la cinétique de la fluorescence chlorophyllienne nous permet d'évaluer divers paramètres liés à l'efficacité photochimique et biochimique de la photosynthèse. L'énergie absorbée peut être utilisée dans les réactions photochimiques de la photosynthèse ou bien être dissipée sous forme de fluorescence chlorophyllienne ou sous forme de chaleur. La fluorescence chlorophyllienne est directement dépendante de l'efficacité de la photochimie photosynthétique des centres réactionnels du photosystème I et II (PSI, PSII). Cette fluorescence est manifestée suite aux variations des interactions entre les réactions photochimiques et biochimiques liées à la photosynthèse et l'état physiologique des plantes (tel le cycle cellulaire) (Stiborová et al. 1986, Maksymiec 1997, Nitschke et al. 1999, Giardi et al. 2001, Ferrat et al. 2003).

L'analyse de la fluorescence chlorophyllienne émise durant la photosynthèse est une des techniques les plus utilisées en recherche fondamentale et appliquée pour le développement de bio-essais. En effet, plusieurs données expérimentales montrent que l'évaluation de l'activité photosynthétique permet la compréhension de la réaction physiologique d'une algue stressée par les conditions environnementales. De nombreux travaux ont démontré l'utilité de la fluorescence chlorophyllienne pour étudier les effets de différents polluants, tels que les métaux lourds (Mallick et al. 2003, Malkin et Niyogi 2000, Papageorgiou 1975) sur la photosynthèse. L'analyse de la cinétique de la fluorescence a permis de déterminer les sites d'action des polluants sur l'appareil photosynthétique et, par conséquent, les effets sur la physiologie des plantes.

À l'aide de ces paramètres, il est possible d'évaluer l'état physiologique des organismes végétaux suite à une exposition à des xénobiotiques présents dans l'environnement. Cependant, plusieurs questions fondamentales subsistent au sujet de l'interprétation de ces paramètres et de leur signification physiologique. Il a été rapporté que le cycle cellulaire, responsable de la prolifération cellulaire, pourrait avoir des effets sur le rendement photosynthétique. Le cycle cellulaire est l'ensemble des événements biochimiques et morphologiques conduisant à la division cellulaire. Un groupe de protéines appelées les complexes Cyclines dépendantes (Cdk), assurent le bon fonctionnement du cycle cellulaire en régissant le passage d'une phase à l'autre du cycle. Le cycle cellulaire est constitué de trois différentes phases caractérisées par divers événements biochimiques. La phase initiale (phase G_0/G_1), est caractérisée par une croissance cellulaire et une augmentation de la synthèse de protéines. La deuxième phase (phase S) se caractérise par l'initiation de la synthèse de l'ADN. La troisième phase (phase G_2/M) est caractérisée par le contrôle de la réplication de l'ADN suivie d'une division des chromosomes et de la cellule (Farinas et al. 2006). Le cycle cellulaire dans un écosystème environnemental peut influencer la croissance de la biomasse ainsi que la structure de la communauté des algues.

Mes études doctorales ont réalisées sur l'étude des divers paramètres de la fluorescence chlorophyllienne durant le cycle cellulaire afin de mieux comprendre l'interaction entre le cycle cellulaire et l'appareil photosynthétique. De plus, il m'a paru important d'étudier l'influence du cycle cellulaire sur la toxicité des xénobiotiques. Ce projet avait pour objectif de mieux comprendre la relation entre les variations des paramètres de la fluorescence chlorophyllienne lors de la photosynthèse durant le cycle cellulaire ainsi que d'analyser l'impact photochimique et moléculaire sur l'appareil photosynthétique de chacune des phases du cycle cellulaire.

L'avancement de ces connaissances fondamentales en photosynthèse permet une meilleure utilisation des paramètres de la fluorescence chlorophyllienne comme marqueurs des effets toxiques des xénobiotiques. L'identification des diverses phases du cycle cellulaire a permis aussi d'étudier les modifications de la toxicité des polluants sur la photosynthèse. La comparaison de la sensibilité de l'ensemble de ces paramètres photosynthétiques et physiologiques permet, d'une part, une meilleure compréhension des mécanismes liant le cycle cellulaire et la photosynthèse mais aussi son effet sur la toxicité des polluants. En complémentarité, cette étude vise à améliorer la sensibilité des bio-essais utilisant les algues vertes lors des tests de toxicité.

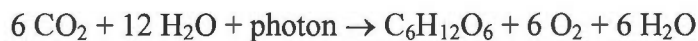
Le chapitre I est une synthèse bibliographique sur le contexte théorique de l'ensemble du projet de recherche effectué. Les problématiques et les objectifs spécifiques du projet de recherche réalisé dans cette thèse seront présentés lors du chapitre II.

CHAPITRE I

LA PHYSIOLOGIE CELLULAIRE VÉGÉTALE

1.1 L'activité photosynthétique

La photosynthèse est le processus de base du métabolisme végétal. Ce phénomène est responsable de l'état physiologique ainsi que de la croissance de la biomasse végétale. La chimie de la photosynthèse peut se résumer ainsi : la transformation de l'énergie lumineuse en énergie chimique. Ce processus s'effectue chez les plantes à l'aide de pigments chlorophylliens fonctionnant comme des antennes collectrices de lumière. Chez les végétaux, la photosynthèse absorbe des photons afin de les convertir en énergie selon l'équation générale suivante (Miller 1979; Whitmarsh et Govindjee, 1999) :



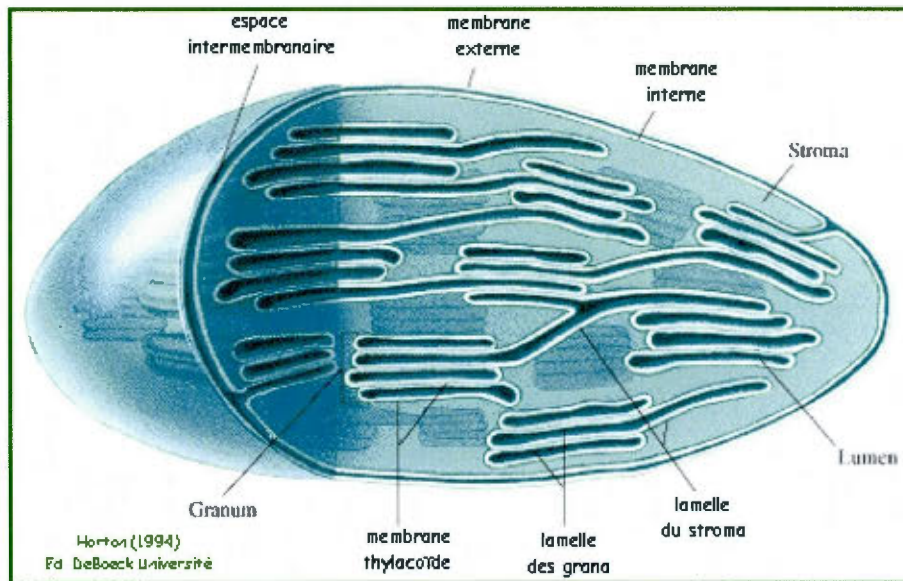
L'ensemble des réactions photochimiques se divisent en deux parties: la phase lumineuse et la phase obscure. La phase lumineuse (photochimique) comprend l'ensemble des réactions photochimiques responsables de la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique. Ces réactions photochimiques sont étroitement liées au transport d'électrons entre les photosystèmes II et I et à la création d'un gradient de protons (impliqué la synthèse et la formation de réserves d'adénosine triphosphate (ATP) et de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH)).

La phase obscure (biochimique) est caractérisée par une activité biochimique indépendante de la présence de lumière. Elle est constituée des réactions biochimiques liées au Cycle de Calvin. Ces réactions utilisent l'ATP et le NADPH précédemment synthétisés pour permettre la fixation du CO_2 , la synthèse de glucides et d'autres processus biochimiques étroitement dépendants de la photosynthèse (Blankenship, 2002). Les processus photochimique et biochimique de la photosynthèse se déroulent dans un organe cellulaire spécialisé appelé chloroplaste.

1.2 Organisation cellulaire

Le chloroplaste est un organe très spécialisé. Cet organe possède deux membranes lipidiques permettant la séparation de la partie interne (stroma) du cytoplasme cellulaire. Ce système membranaire régit le transport gazeux (O_2 et CO_2), des ions (Mg^{2+} , Ca^{2+} et H^+) ainsi que le transport des molécules de glucide nécessaires au fonctionnement de la photosynthèse. Les réactions photochimiques s'effectuent grâce à des pigments situés sur le système membranaire à l'intérieur des chloroplastes que l'on appelle thylacoïde. Les enzymes et les cofacteurs qui interviennent durant la photosynthèse sont situés dans le stroma du chloroplaste (figure 1).

A



B

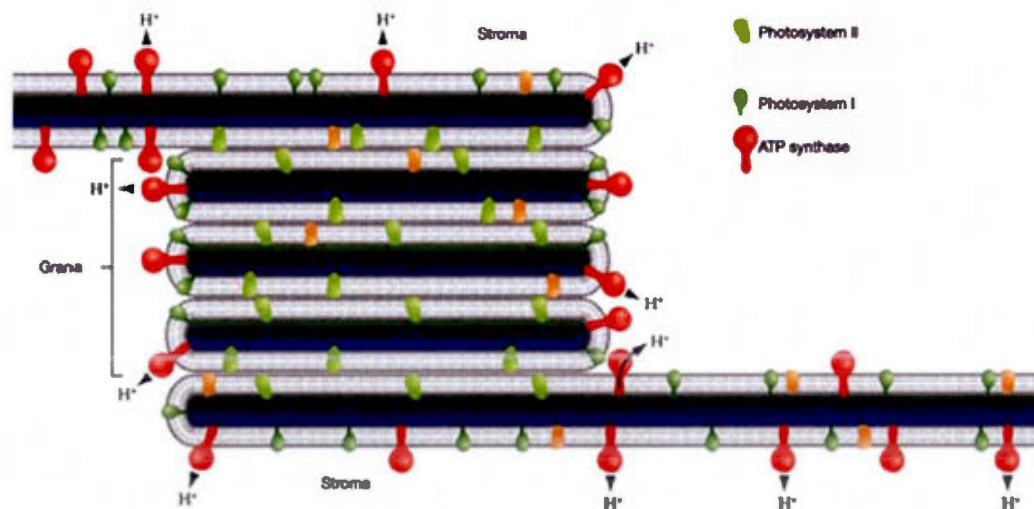


Figure 1: A : Schémas de la structure et de l'agencement interne d'un chloroplaste chez les algues. (Selon Horton 1994) B: Structure schématique d'un Thylacoïde (d'après Malkin et Niyogi, 2000)

Les thylacoïdes sont une ensemble de vésicules aplaties (les lamelles) empilées les unes sur les autres afin de former les *granas* (empilement de 10 à 20 lamelles). Les granas sont ensuite reliées entre eux dans le chloroplaste par des thylacoïdes simples non empilés (Mustárdy et Garab 2003). L'espace à l'intérieur du thylacoïde se nomme lumen et à l'extérieur se nomme le stroma. On retrouve à l'intérieur des membranes des thylacoïde, divers complexes de protéines-pigments qui sont essentiels à la photochimie et au transport des électrons (Malkin et Niyogi, 2000 ; Dekker et Boekema, 2005). On retrouve dans la membrane du thylacoïde quatre types de complexes pigments-protéines :

1. Complexe de pigments photosynthétiques formant les antennes collectrices de lumière des photosystèmes II (*light harvesting complexe* : LHCII) et I (LHCI) associés à des protéines membranaires.
2. Les centres réactionnels du photosystème II (PSII) et du photosystème I (PSI) où s'effectue la photochimie primaire suite au transfert de l'énergie d'excitation par les LHCII et LHCI.
3. Un ensemble de plastoquinones (PQ) cytochromes b6f et de plastocyanines (PC) responsables du transfert des électrons entre le PSII et le PSI.
4. Complexe de l'ATP synthétase qui permet la synthèse de ATP à partir de l'ADP et de phosphate grâce à un flux de protons entre le lumen et le stroma.

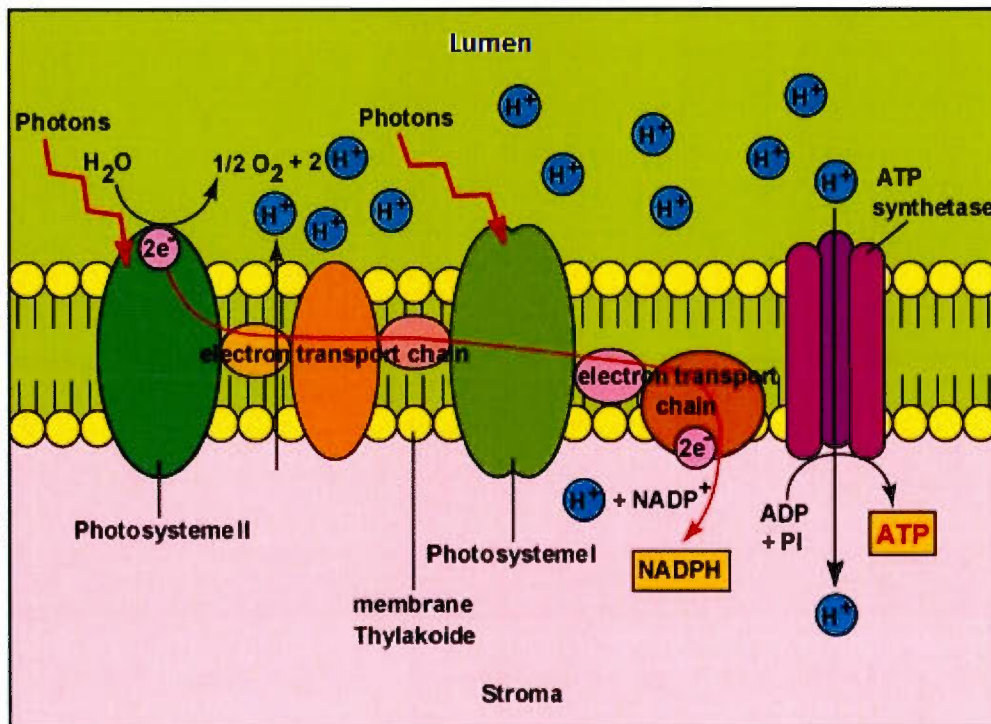


Figure 2: Représentation schématisé des transporteurs d'électrons dans la membrane du thylacoïde. Les complexes membranaires sont les photosystèmes II et I, le cytochrome b₆f, la plastocyanine et l'ATP synthétase (Selon Horton 1994).

Le PSII et LHCII sont localisés principalement dans le grana, comparativement au PSI, LHCI et ATP synthétase qui sont généralement situés dans les lamelles stromatiques et les régions marginales du grana. Les cytochromes b₆f sont présents dans le grana ainsi que dans les lamelles stromatiques.

1.3 La structure du photosystème II

Le PSII est formé d'un complexe de pigments-protéines, d'un complexes métallo-protéiques et d'ions de chlorure et de calcium (servant de cofacteurs) (Ort et Whitmarsh, 2001). Le PSII est structuré en sous-unités permettant un fonctionnement plus efficace. Il est composé d'antennes collectrices de lumière et d'un centre réactionnel (RCII) comprenant le complexe de dégagement d'oxygène (CDO).

1.3.1 Le complexe collecteur du photosystème II

Le LHCII est un complexe composé de pigments-protéines qui se divise en deux partie, soit: les antennes internes et l'antenne périphérique du PSII (Owens 1996). La différence entre les antennes internes et périphériques se résume essentiellement à leur composition en pigments et par leur localisation.

Les antennes internes sont associées étroitement au centre réactionnel du PSII. Les LHCII internes sont constituées des protéines CP43 et CP47 (gènes chloroplastiques *psbC* et *psbB*, possédant un poids moléculaire de 43 et 47kDa respectivement) et d'environ 40 à 50 molécules de chlorophylle (Chl) *a* ainsi que d'une dizaine de molécules de β -carotène (Barber et Kuhlbrandt, 1999). Le rôle de ce complexe est de transférer l'énergie lumineuse captée par les molécules de Chl vers le centre réactionnel de PSII, la molécule P680.

Les antennes périphériques sont composées des complexes protéines-pigments CP29, CP26 et CP24. Ces protéines sont associées aux molécules de Chl *a* et *b* ainsi qu'aux divers caroténoïdes tels que la lutéine, la néoxanthine, la violaxanthine et la zéaxanthine (Bassi et al. 1990). La composition pigmentaire exacte et la taille des antennes périphériques varient selon le temps et l'intensité de l'exposition lumineuse auxquels les végétaux sont exposés (Horton *et al.* 1996).

Le complexe LHCII constitue le centre de captation majeure de la lumière du PSII. Il contient environ 50 à 60% de la quantité totale de la chlorophylle (*a* et *b*) ainsi que le tiers de la quantité totale de protéines des membranes du thylacoïde (Thromber *et al.*, 1991). Trois types de polypeptides composent le LHCII. Il est composé de Lhcb1, 2 et 3 (provenant des gènes *Lhcb1*, 2 et 3) dont le poids moléculaire est compris entre 24 et 29kDa (Green et Durnford, 1996). Les complexes pigments-protéines CP29, CP26 et CP24 qui composent les antennes périphériques (connues sous le nom de protéines Lhcb4, Lhcb5 et Lhcb6) contiennent une quantité plus faible de Chl *b* que le LHCII interne. Elles sont constituées de 5 à 10% de la chlorophylle totale liée au PSII (Barber et Kuhlbrandt, 1999). Ces protéines situées à la périphérie du LHCII permettent le transfert de l'énergie d'excitation du LHCII vers le centre réactionnel du PSII grâce aux protéines CP43 et CP47 (Bassi *et al.*, 1997, figure 3)

Chez les végétaux (plantes et algues), la présence de métaux lourds (le cadmium, le chrome) et les herbicides (comme l'atrazine) dans l'environnement peut entraîner des modifications au niveau du LHCII, par exemple l'inhibition de l'activité de l'enzyme protochlorophyllide réductase (Patsikka *et al.* 2002 ; Gonzalez-Barreiro *et al.* 2004 ; Mysliwa-Kurdziel et Strzalka, 2005). Cette inhibition entraîne une diminution de la synthèse de la chlorophylle. Cette diminution affecte la formation des LHCII et mène à une altération de l'état fonctionnel du PSII. La réduction de l'efficacité opérationnelle du PSII entraîne une diminution de l'activité photochimique primaire et par ce fait, d'une diminution de la croissance végétale.

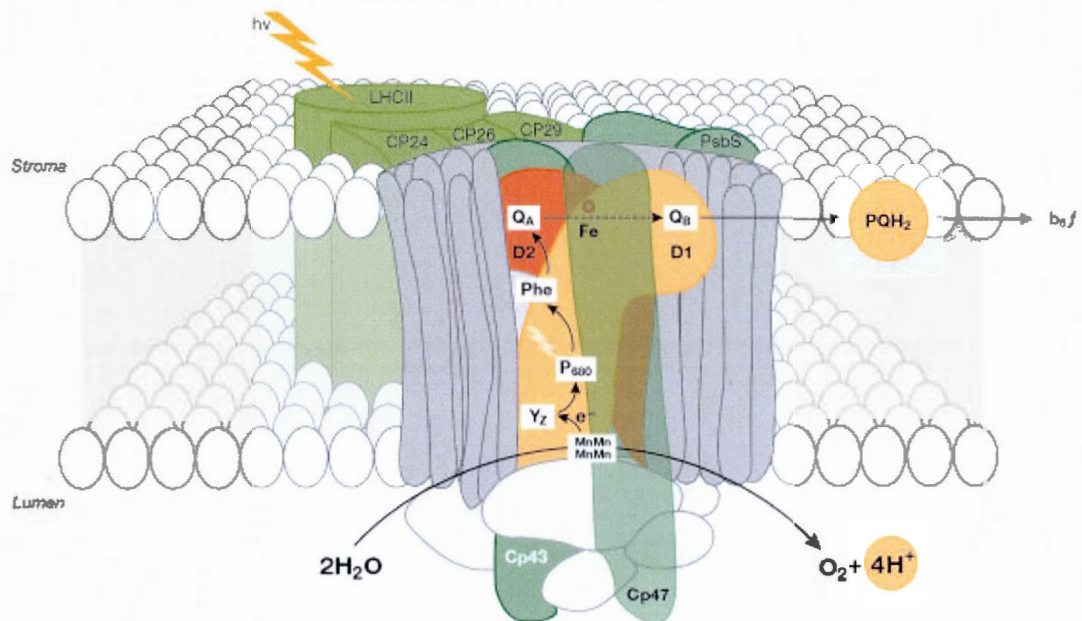


Figure 3: Modèle structurel du PSII montrant les deux protéines D1 et D2, le complexe de photolyse de l'eau (constitué de 3 protéines de poids moléculaire 33, 24 et 17 kDa), les protéines constituant l'antenne collectrice de lumière (LHCII, CP24, CP26 et CP29) et les protéines liant la chlorophylle a : la CP43 et CP47 (d'après Szabo et al., 2005)

1.3.2 Le centre réactionnel du photosystème II

La photochimie primaire s'effectue au niveau du centre réactionnel du photosystème II. Le RCII est constitué de deux protéines majeures, soit D1 et D2 (de poids moléculaire de 32 et 34kDa, respectivement). Ces protéines assurent la stabilité de la structure du complexe des pigments de chlorophylle et des transporteurs d'électrons liés aux PSII. La réaction photochimique est déclenchée par la séparation de charges suite à la photolyse de l'eau au niveau de la protéine D1. Cette séparation de charges initie le transport des électrons entre le PSII et le PSI (Dekker et Van Grondelle, 2000). Le centre réactionnel contient une paire spéciale de chlorophylle *a* (P680, possédant une absorption maximale de la lumière à une longueur d'onde de 680 nm (Govindjee et Coleman, 1990) qui joue un rôle primordial dans la séparation de charges. Cette paire de Chl *a* spéciale permet la séparation de charges qui donne le nom P680 au RCII.

Dans l'environnement, l'illumination de plantes exposées à des métaux lourds, peut causer la photoinhibition du PSII occasionné par des dommages aux composantes protéiques du RCII (Giardi *et al.* 1997). Cette inhibition serait liée au transport d'électrons et de la photolyse. Une étude a rapporté qu'une exposition à une concentration de 5µM de cadmiun (Cd) induit une diminution du taux de protéines D1 et D2 chez la plante *Oryza sativa* suite à une exposition de 30 minutes. Ces résultats montrent une altération par le Cd²⁺ du recyclage (*turnover*) de la protéine D1 qui serait dû à une inhibition de la synthèse des polypeptides D1 ou par une dégradation accrue de celle-ci. Sous les mêmes conditions expérimentales, CP43 et LHCII, n'étaient pas affectés par la présence du Cd²⁺ (Pagliano *et al.* 2006). Il a été démontré chez la plante *Pisum sativum*, grâce à la méthode de radiodétection par « *Pulse-chase* » (incorporation de méthionine radioactive dans les polypeptides D1), que la synthèse de la protéine D1 est inhibée par la présence de Cd²⁺ ce qui cause une réduction de l'activité photochimique du PSII (Franco *et al.* 1999).

La présence d'herbicide comme pour la présence de métaux lourds, peut induire une inhibition du rendement photochimique du PSII. Les herbicides de type phénoliques peuvent inhiber la chaîne de transport d'électrons du PSII en se liant au site de la quinone B (Q_B) sur la protéine D1. Cette liaison entre les molécules d'herbicide- Q_B accélère la dégradation de la protéine D1 suite à une formation d'espèces réactives de l'oxygène (l'oxygène singulet 1O_2) causant une photoinhibition du PSII (Nakajima *et al.* 1996 ; Fufezan *et al.* 2002, Rea *et al.* 2009). Les herbicides de type triazine (l'atrazine, par exemple) possèdent la capacité de se fixer également au site Q_B , inhibant la chaîne de transport des électrons entre les PSII et PSI (Nakajima *et al.* 1996, Chalifour *et al.* 2009).

1.3.3 Le complexe de dégagement d'oxygène (CDO)

Chez les végétaux, la photolyse de l'eau s'effectue grâce à un système enzymatique composé d'un tétramère («*cluster*») de manganèse (Mn_4Ca) et de quatre polypeptides extrinsèques de 33, 24, 17 et 10kDa (codés par les gènes nucléaires *PsbO*, *PsbP*, *PsbQ* et *PsbR*; figure 3 et 4, De Las Rivas *et al.* 2004). La présence de ces polypeptides est essentielle pour la stabilité et le fonctionnement du PSII. Le polypeptide de 33kDa joue un rôle au niveau de stabilisation de complexe Mn_4Ca et favorise la liaison des ions Cl^- et Ca^{2+} au système de la photolyse de l'eau (Miyao et Murata 1984, Heredia et De Las Rivas 2003, Popelkova *et al.* 2006). Suite à une acidification du pH du lumen (environ 5,7) le polypeptide de 33kDa subit un changement de conformation. Ce changement favorise la liaison des ions Mn^{2+} et Ca^{2+} (Shutova *et al.* 2005). De plus, cette protéine est essentielle au fonctionnement du PSII en favorisant la stabilité des protéines CP47, CP43, D1 et 17kDa (Yi *et al.* 2005).

Les polypeptides de 24 kDa et 17 kDa optimise le rendement du CDO par l'ajustement des concentrations d'ions Ca^{2+} et Cl^- et des cofacteurs à la réaction d'oxydation de l'eau (Seidler, 1996; Haumann et Jung, 1999 ; Wincencjusz *et al.* 1999). Ces polypeptides favorisent la liaison de divers complexes de PSII permettant la formation de structures macromoléculaires des PSIIs et la superposition des *gran*as de thylacoïdes (Suorsa et Aro, 2007).

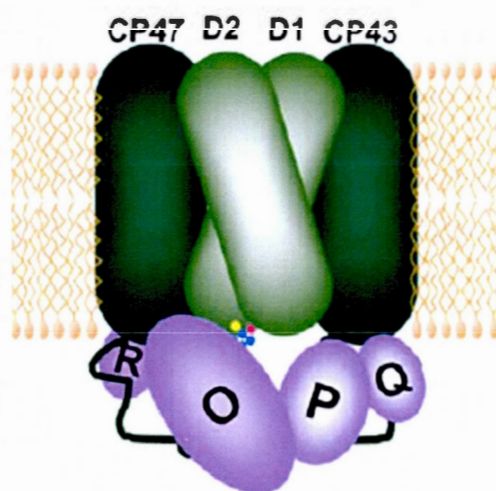


Figure 4: Structure du PSII chez les algues, il est formé d'une partie intrinsèque (formé par CP47, CP43, D1 et D2) et d'une partie extrinsèque responsable du dégagement d'oxygène (formé par 33, 24, 17 et 10kDa codé par Psb O, U, Q et R) (d'après Roose *et al.* 2007)

La présence de métaux lourds dans l'environnement peut induire une inhibition de la chaîne de transport des électrons. Cette inhibition serait due à une altération des polypeptides associés au CDO. L'effet toxique des métaux lourds peut varier en fonction de leur mécanisme d'action ainsi que des conditions environnementales. Par exemple, le plomb et le zinc cause une inhibition de l'activité du PSII suite à des modifications de la structure du CDO, en particulier sur le polypeptide 24kDa chez *Spinacea oleracea* (Rashid *et al.* 1994).

Dans le cas d'autres métaux tels que le mercure, une altération du polypeptide 33kDA a été observé chez *S. oleracea* (Bernier et Carpentier 1995). Cette modification occasionne une déstabilisation du Mn_4Ca , inhibant l'oxydation de l'eau.

1.4 Aspects fonctionnels du photosystème II

Suite à l'arrivée d'un photon, l'énergie lumineuse est absorbée au niveau des antennes collectrices de lumière à l'aide des nombreux pigments tel que : la Chl *a*, la Chl *b*, les pigments accessoires et les caroténoïdes. La structure moléculaire de chaque pigment lui permet d'absorber la lumière à différentes longueurs d'ondes spécifiques (figure 5).

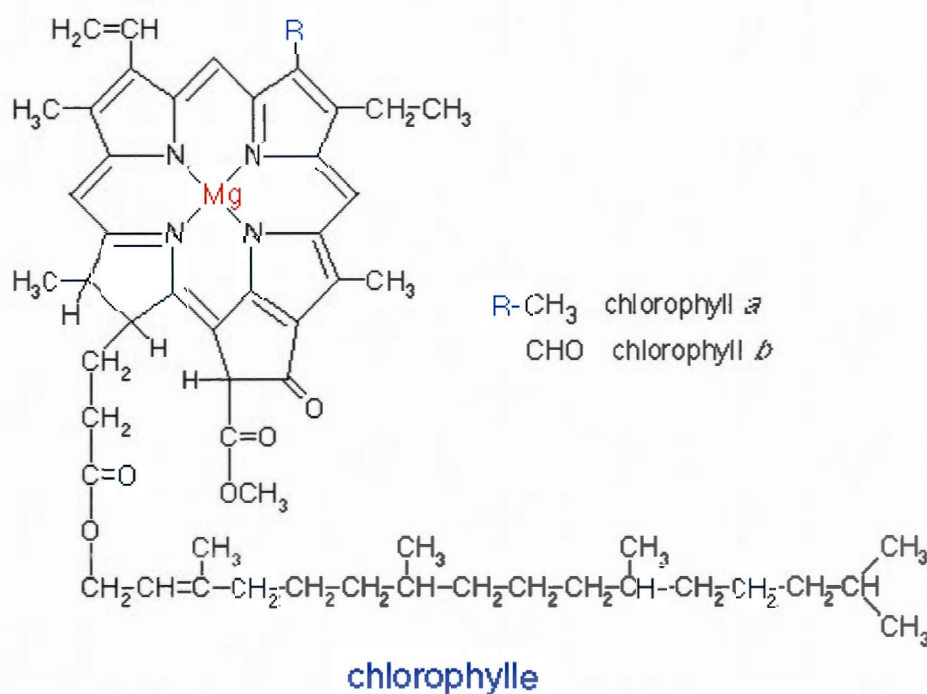


Figure 5: Structure moléculaire de la chlorophylle *a* et *b* (Govindjee and Govindjee, 1974)

La somme des spectres d'absorption (figure 6) couvre presque entièrement le spectre d'émission du visible permettant au photosystème d'exploiter efficacement l'énergie lumineuse présente (Govindjee and Govindjee, 1974).

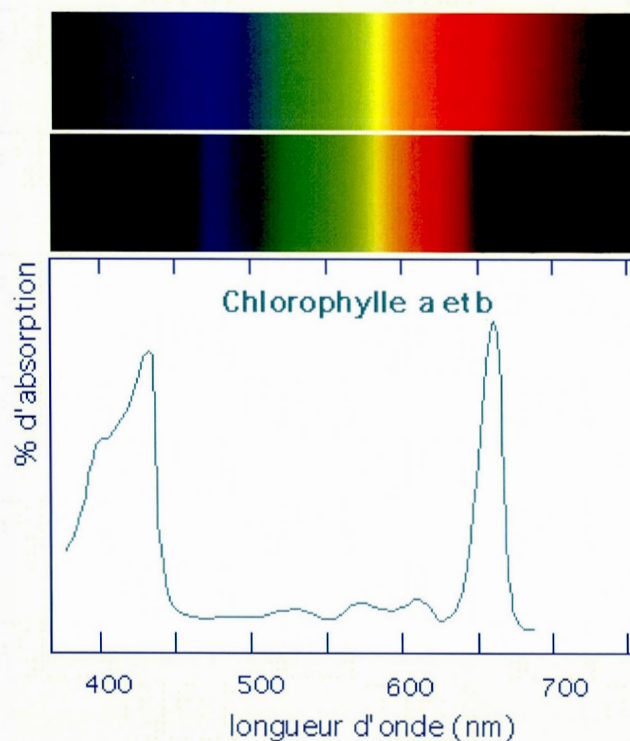


Figure 6: Spectre d'absorption des chlorophylles a et b chez les plantes supérieures (d'après Raven et al. 2000).

L'absorption d'un photon provoque l'excitation du pigment photosynthétique. Celui-ci passe rapidement (10^{-15} s) de son état fondamental (faible énergie) à un état excité (grand énergie). La chlorophylle possède deux niveaux maximums d'absorption de photons. Il est possible d'observer deux niveaux d'énergie (état singulet excité, $^1\text{Chl}^*$). Le premier se forme suite à l'absorption de la lumière rouge et le deuxième par l'absorption de la lumière bleu (Figure 7, Buchanan *et al.* 2000).

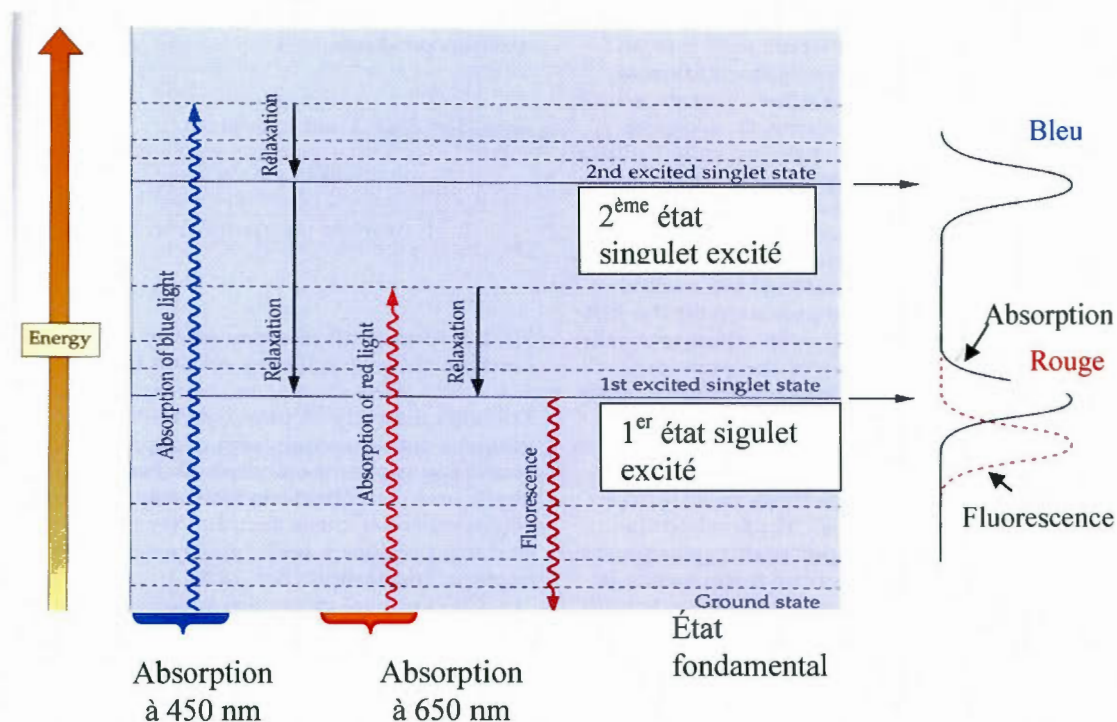


Figure 7: Les niveaux d'énergie dans une molécule de chlorophylle et les mécanismes de dissipation de son énergie absorbée (d'après Buchanan et al. 2000).

L'énergie d'excitation est transférée par résonance et aléatoire d'une molécule de chlorophylle à l'autre au niveau des LHCII jusqu'à la paire spéciale de la chlorophylle *a* (P680) du CR du PSII (Figure 7 ; Raven *et al.*, 2000). Une fois que l'énergie arrive dans ce dimère de Chl *a*, la séparation de charge s'effectue et induit le transport d'électrons.

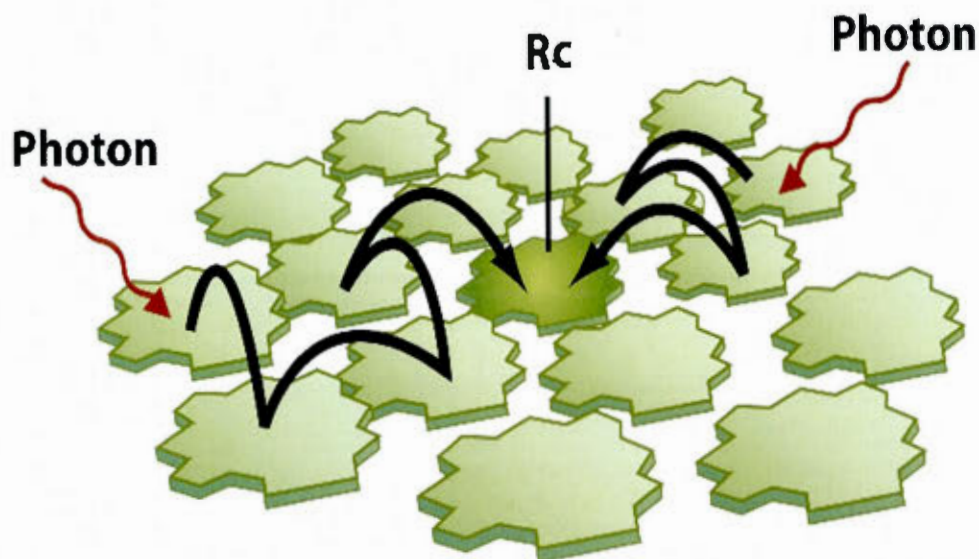


Figure 8: Transfert d'un photon absorbé d'un pigment photosynthétique à un autre de façon aléatoire vers le P680 (d'après Raven et al. 2000 ; Jupin et Lamant. 1999)

Des études ont démontré que la présence de métaux lourds tels que le mercure (Hg) est capable d'induire une inhibition au niveau de la synthèse de la chlorophylle *a* chez *Synechococcus elongatus*. Cette inhibition modifie le spectre d'absorption du LHC et provoquent une diminution de rendement de la captation du LHC et par ce fait limitant le transfert de l'énergie lumineuse absorbée vers les centres réactionnels du PSII (Murthy *et al.* 1995).

1.4.1 Dissipation d'énergie au niveau du photosystème II

Lors de l'absorption d'un photon par un pigment photosynthétique, l'énergie lumineuse peut être dissipée sous 4 formes :

1. Photochimie
2. Chaleur
3. Fluorescence
4. Formation d'espèce réactive d'oxygène (ERO)

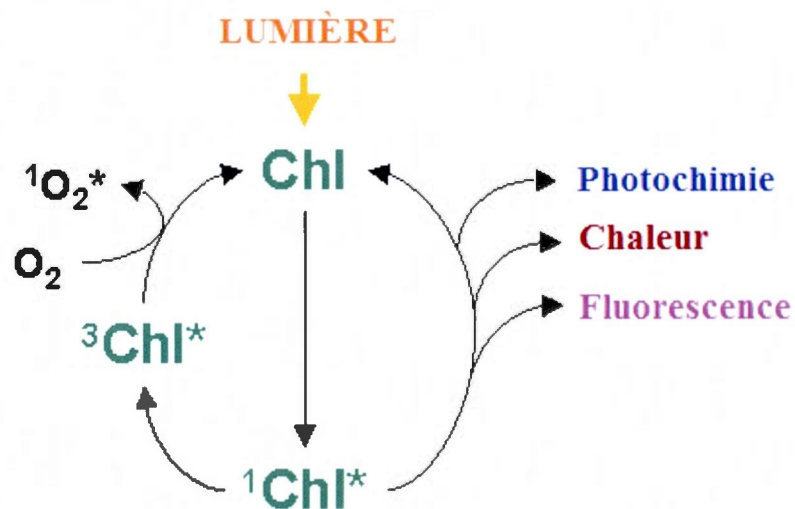


Figure 9: Voies de dissipation d'énergie de la chlorophylle excitée du PSII (d'après Müller et al. 2001).

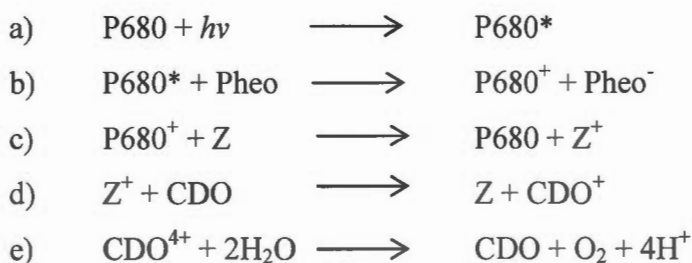
Ces quatre voies de dissipation de l'énergie de la Chl* sont en compétition entre elles. L'augmentation de la dissipation d'énergie sous une voie entraîne automatiquement une diminution via les trois autres formes. La mesure de la dissipation de l'énergie sous forme de chaleur ou de fluorescence permet d'établir le rendement photosynthétique du LHCII et du PSII.

1.4.2 La séparation de charges et la photolyse de l'eau

Le rendement photosynthétique de la réaction de la photochimie primaire du PSII repose sur le transfert d'électrons du centre réactionnel P680 à l'état excité (P680*) vers la phéophytine *a* (Phéo). Une fois au niveau du CR du PSII, l'énergie du photon oxyde le P680 en P680⁺. Cette oxydation permet l'induction de l'hydrolyse de l'eau qui entraîne une séparation de charges au niveau du RCII. Cette séparation de charges induit l'état P680⁺/Phéo⁻ dans le PSII (Dekker et van Grondelle, 2000). Cependant, la réaction photochimique de l'excitation de la P680 ne génère qu'une seule charge positive. Par conséquent, la formation d'une molécule oxygène (O₂) exige la formation de quatre charge positive (Hall et Rao, 1994; Whitmarsh et Govindjee, 2002).

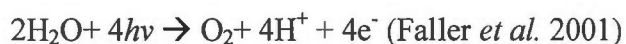
Suite à cette perte d'électron, le P680⁺ reçoit un électron du résidu tyrosine (Z) de la protéine D1. Le résidu tyrosine (Z) de la protéine D1 est le donneur primaire du PSII. Une fois oxydé, le PSII accepte un nouvel électron du complexe de dégagement d'oxygène (CDO) (Figure 10).

Cette séparation de charges et le dégagement d'oxygène se résume par les cinq réactions suivantes :



L'énergie d'excitation ($h\nu$) provenant d'un photon capté par LHCII, transférée au CR du PSII (P680), induit successivement quatre réactions photochimiques (décrites de **a** à **d**) permettant une seule séparation de charges (ou la formation d'une seule charge positive) au niveau CDO. La photo-oxydation de l'eau pour la formation

d'une molécule d'oxygène nécessite quatre séparations de charges suite à l'absorption de quatre photons (réaction e, Dekker et Van Grondelle, 2000). L'ensemble des réactions photochimiques peut se résumer par l'équation suivante :



Suite à une adaptation à l'obscurité des chloroplastes, il a été observé que le rendement de formation d'oxygène durant la photo-oxydation de l'eau passait par un cycle de 5 étapes qui sont reconnus comme les états « S₀, S₁, S₂, S₃ et S₄ » (schématisés aux figures 10 et 11). Le rendement maximal du dégagement d'oxygène est obtenu suite au troisième éclair et de façon cyclique par la suite à tous les quatre éclairs (figure 10). Le modèle des états «S» permet une meilleure compréhension du phénomène de la photo-oxydation de l'eau par la photochimie. Le «*cluster*» de manganèse du CDO accumule des charges positives suite à une perte des électrons. Cette accumulation fournit l'énergie potentielle nécessaire pour la séparation de deux molécules d'eau en oxygène et libère quatre protons dans le lumen. Ces protons dans le lumen contribuent à la formation d'un gradient transmembranaire nécessaire pour l'ATP synthétase. Une fois l'état S₄ atteint, le CDO retourne spontanément à l'état S₀ suite à une interaction avec une molécule d'eau qui libère des électrons et produit de l'oxygène (figure 11, Kok *et al.* 1970).

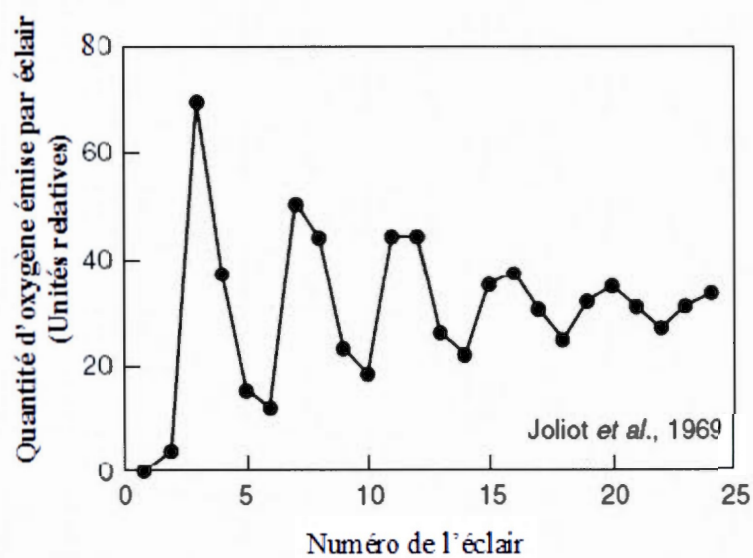


Figure 10: Dégagement de l'oxygène suite à des éclaires saturantes (d'après Joliot et al. 1969)

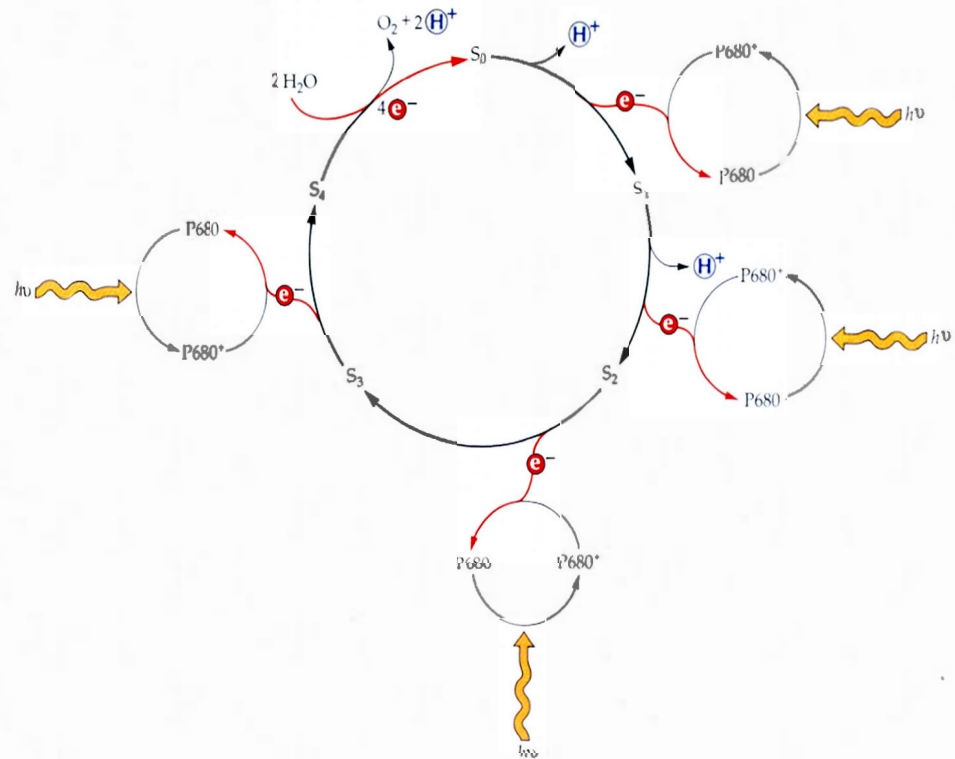


Figure 11: Schéma de la formation des états «S» et la production de protons dans le lumen durant la photo-oxydation de l'eau et le dégagement d' O_2 (d'après Buchanan, 2000)

1.4.3 Le transport transmembranaire des électrons

Suite à la première séparation de charge dans le PSII, un électron est émis et cause la réduction de la phéophytine *a*. Celui-ci est ensuite transféré, grâce à des réactions d'oxydoréductions, par une chaîne de transporteurs composés des quinones A et B (Q_A , Q_B), de plastoquinones (PQ), cytochrome b_6f et plastocyanine (PC). La réduction de la PQ nécessite deux électrons provenant de Q_A et Q_B (Baker *et al.* 2007). La réduction de PQ entraîne une modification stéréochimique $PQ \rightarrow PQH_2$, lui permettant de transporter deux protons vers le *lumen* pour se neutraliser (Heller *et al.* 1998, figure 12). La modification stéréochimique de PQH_2 lui permet de diffuser à travers les membranes du thylacoïde et la libération de Q_B qui peut de nouveau accepter les électrons Q_A (Whitmarsh et Govinjee 2002).

L'objectif de la chaîne de transport d'électrons est de transférer les électrons produits suite à la photo-oxydation de l'eau du PSII vers PSI et ce jusqu'à l'accepteur final le NADP.

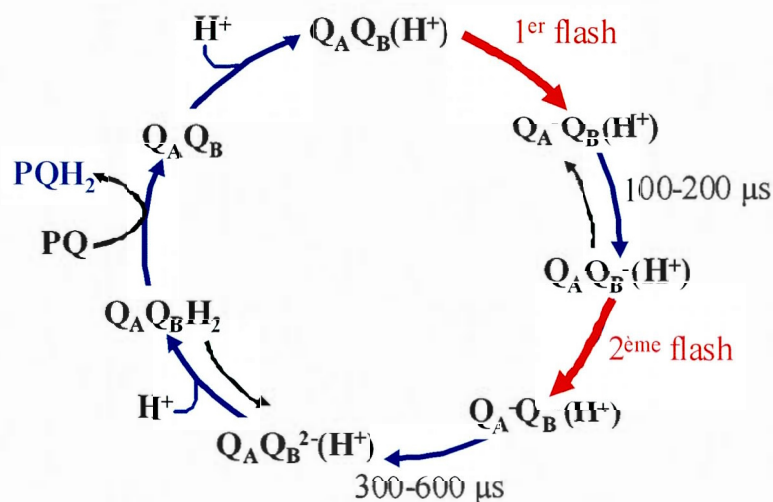


Figure 12: Représentation schématique de la chaîne de transport de l'électron par oxydoréduction de P680 vers entre les quinones A (Q_A), B (Q_B) et plastoquinone (PQ) (d'après Whitmarsh et Govindjee, 2002)

La molécule de PQH_2 va par la suite réduire le cytochrome b_6f . Cette réduction libère deux H^+ dans le lumen du thylacoïde contribuant aussi une fois à la formation du gradient de protons. Le cytochrome b_6f transfère son électron à la plastocyanine, puis au $P700^+$ du PSI. Les électrons, suite à la chaîne d'oxydoréduction, sont absorbés par PC, le donneur d'électrons du PSI ($P700^+$; Ort, 1986; Faller *et al.*, 2001). Une fois dans le PSI, l'électron est transféré à la ferrédoxine. La synthèse du NADPH est catalysée par la ferrédoxine NADP-réductase (figure 13). Le NADPH est utilisé comme réducteur au cours du cycle de Calvin lors de la fixation du CO_2 et de la synthèse des hydrates de carbone durant le cycle de Krebs. Le gradient de protons formé lors du transport des électrons vers le PSI permet le fonctionnement de l'ATP synthétase permettant ainsi une synthèse accrue d'énergie chimique pour l'algue (Malkin et Niyogi, 2000).

Le transport d'électrons est dépendant des différences de potentiel redox entre les donneurs et accepteurs d'électrons. L'ensemble des différences de potentiel d'oxydoréduction est résumé dans le schéma Z selon le modèle de Hill et Bendall (figure 13).

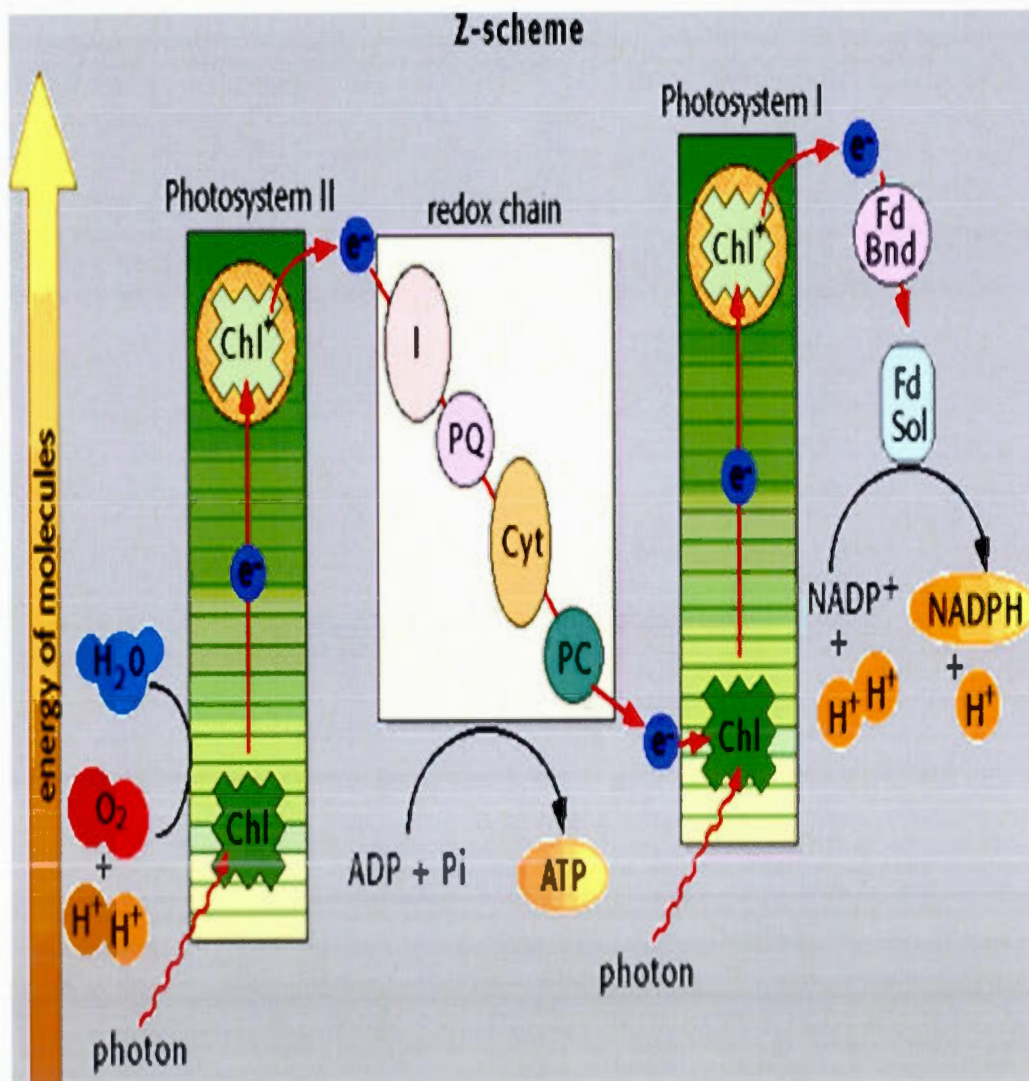


Figure 13 : Schéma en Z résumant les réactions de transfert d'électrons photosynthétique selon leur potentiel d'oxydoréduction. Le P680 et P700 sont les centres réactionnels du PSII et du PSI. La réduction du P680* et P700* provient de l'absorption de l'énergie lumineuse ($h\nu$). Les PQ, Cyt et PC sont les accepteurs d'électrons du PSII. NADP-réductase qui réduit le $NADP^+$ en NADPH situé à la fin de la chaîne de transport d'électron (d'après Whitmarsh, 1998).

La majorité des métaux lourds ont un effet sur la photochimie primaire suite à l'inhibition de la chaîne de transport d'électrons et ce, autant des côtés oxydant et réducteur du PSII. Il a été rapporté que le Zn, Co et Cd sont en mesure d'induire chez *Chlorella pyrenoidosa*, une diminution du CDO. Cette inhibition est liée à la modification de l'activité catalytique de la photolyse de l'eau (Plekhanov et Chemeris, 2003). La présence de Hg et le Cd causent une inhibition associée à deux mécanismes. Le premier est causé par la liaison des métaux lourds aux résidus tyrosines des protéines D1 et D2 du centre réactionnel du PSII, inhibant la réaction photochimique et diminuant la concentration de protéine D1 dans le PSII. Le deuxième mécanisme d'inhibition implique le « *cluster* » de manganèse, inhibant la photolyse de l'eau (Sersen et Kralova, 2001).

Les effets inhibiteurs du Cd se trouvent du côté oxydant dans le PSII. Cette inhibition est associée à un déplacement de l'ion Ca^{2+} par le Cd dans le « *cluster* » de manganèse du complexe de photolyse de l'eau. Le déplacement de l'ion Ca^{2+} empêche la formation de l'état S_2 lors de la photolyse de l'eau. L'inhibition de l'état S_2 diminue grandement le rendement de dégagement d'oxygène. Sous ces conditions, une diminution du transfert des électrons provenant des résidus tyrosine Z et P680^+ vers Q_A^- et Q_B est observée. Cette diminution affecte aussi le transfert d'électrons entre les PSII et PSI (Sigfridsson *et al.* 2004).

Le complexe de photolyse de l'eau et la chaîne de transport d'électrons dans le PSII sont les principales cibles de l'inhibition causée par la présence des métaux. Toute altération de ces systèmes entraîne automatiquement une diminution du rendement photochimique du PSII. Les mécanismes de toxicité du chrome, étudiés par les paramètres de la fluorescence chlorophyllienne, seront présentés dans les sections suivantes.

La majorité des herbicides utilisés dans l'agriculture agissent sur l'activité photochimique du PSII. Ils agissent en inhibant la chaîne de transport d'électrons au niveau de Q_B . L'impact de cette inhibition occasionne une réduction du taux de synthèse de l'ATP et du NADPH et par conséquent une diminution de la croissance et le développement végétale. Les herbicides de type triazines se lient au Q_B «binding site» empêchant l'oxydation de Q_A^- et la liaison avec la PQ (Krieger-Liszkay et Rutherford, 1998; Ikeda *et al.* 2003). Les algues illuminées exposées à ce type d'herbicides subiront une inhibition de transport d'électrons suite à la réduction constante de Q_A . De plus, l'arrêt de la chaîne de la chaîne de transport favorise la formation des espèces réactives de l'oxygène via la formation de l'état triplet de la chlorophylle (Rutherford et Krieger-Liszkay, 2001; Fufezan *et al.* 2002).

1.5 Structure et fonctionnement du photosystème I

Le photosystème I (PSI), chez les algues et chez les végétaux photosynthétiques supérieurs, est fonctionnellement lié au PSII grâce aux transporteurs d'électrons PQ et PC. Le PSI est très similaire au PSII mais comporte plusieurs différences majeures au niveau structurel et fonctionnel. Le PSI est constitué d'un complexe composé de 19 sous-unités polypeptidiques, d'environ cent soixante-quinze molécules de Chl, deux phylloquinones ainsi que trois groupements Fe_4S_4 (Ben-Shem *et al.* 2003). Le PSI est composé de deux grandes unités fonctionnelles; l'antenne collectrice de lumière (LHCI) et le centre réactionnel (P700, CRI).

1.5.1 Les antennes collectrices de lumière du photosystème I

Le LHCI est un complexe composé de pigment-protéines que l'on peut diviser en deux types: les antennes internes et l'antenne périphérique du PSII (Jordan *et al.*, 2001). La différence entre les antennes internes et périphérique se résume essentiellement à leur composition en pigments et par leur localisation.

Les antennes internes, associées étroitement au centre réactionnel du PSI, sont constituées d'une centaine de molécules Chl *a*, d'une vingtaine de molécules de β -carotène, le tout lié au CRI par le PsaA et PsaB (Jordan et al 2001). Les antennes périphériques sont composées de soixante-quinze molécules Chl *a*, de divers caroténoïde tels que la lutéine, la néoxanthine, la violaxanthine et la zéaxanthine (Schmid et al 2002). La composition pigmentaire exacte et la taille des antennes périphériques varient selon le temps et l'intensité de l'exposition lumineuse auxquels les végétaux sont exposés (Horton et al 1996).

Le rôle de ces deux complexes est de transférer l'énergie lumineuse captée par les molécules de Chl vers le centre réactionnel de PSI, la molécule P700.

1.5.2 Le centre réactionnel du photosystème I (CRI)

Le centre réactionnel du PSI est composé de 17 sous-unités protéiques (PsaA à PsaN, Knoetzel et al. 2002; Ben-Shem et al. 2003; Khrouchtchova et al., 2005). La figure 14 illustre la disposition de ces différentes sous-unités protéiques.

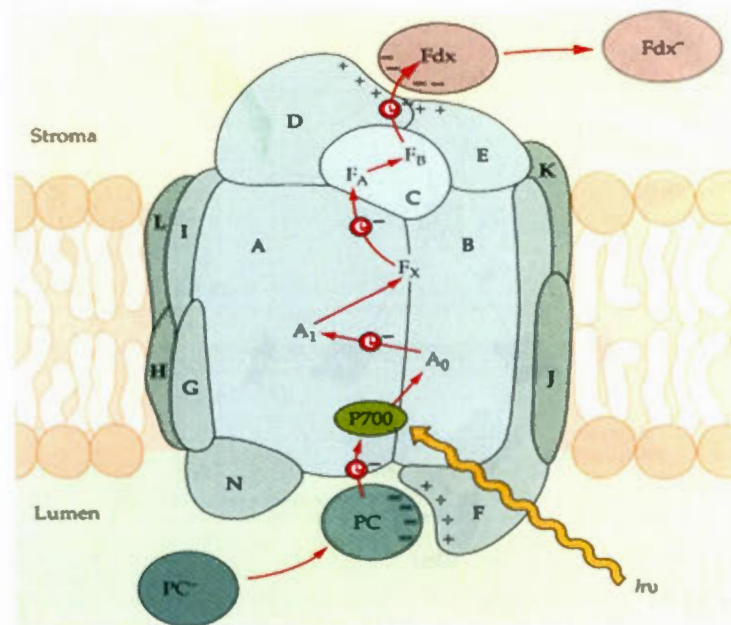


Figure 14: Schéma de l'organisation structurale du PSI et de ses différentes composantes protéiques (indiquées par les lettres ; Malkin et Niyogi, 2000 ; les abréviations sont explicitées p. 12).

1.5.3 Fonctionnement du photosystème I

Le PSI fonctionne essentiellement de façon semblable au PSII. Suite à l'absorption d'un photon par les antennes collectrices de lumière du PSI et la transmission de celui-ci vers le CRI, le P700 passe à un état excité P700*. Dans le PSI, la séparation de charges s'effectue entre le P700* et une molécule de Chl α , notée A₀. Le P700⁺ récupère un électron provenant de la plastocyanine (Jensen et al 2007). Les électrons reçus par la phylloquinone, A₁, sont transférés vers la ferrédoxine (Fdx) en passant par les complexes protéiques Fe-S (indiqués par F_x, F_A et F_B ; figure 15 ; Malkin et Niyogi 2000). L'accepteur terminal d'électrons de la chaîne de transport d'électrons dans le PSI est le NADPF. Le NADP⁺ est catalysée en NADPH par la ferrédoxine NADP-réductase. Le NADPH est utilisé comme réducteur au cours du cycle de Calvin lors de la fixation du CO₂ et lors de la synthèse des hydrates de carbones (glucides) durant le cycle de Calvin (Raines, 2003). Le gradient de protons formé lors du transport des électrons vers le PSI permet le fonctionnement de l'ATP synthétase permettant ainsi une synthèse accrue d'énergie chimique pour l'algue (Malkin et Niyogi. 2000).

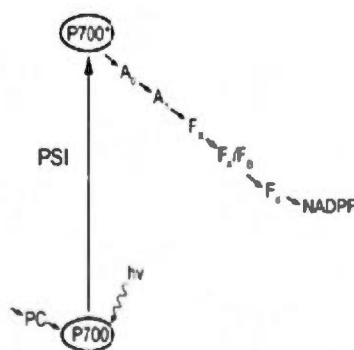


Figure 15: PC transporte les électrons vers le PSI. A₀, A₁, F_x, F_A/F_B et F_D sont les accepteurs d'électrons du PSI. NADPF est l'enzyme ferrédoxine NADP-réductase qui réduit le NADP⁺ en NADPH (d'après Whitmarsh, 1998).

1.6 La photophosphorylation liée à la formation du gradient de protons dans le lumen

Mitchell (1974) a démontré que la synthèse de l'ATP est contrôlée par un couplage «chimioosmotique» lié à la chaîne de transport membranaire des électrons ainsi qu'à la formation du gradient de protons dans le lumen. Cette théorie a été par la suite démontrée par de nombreux travaux. Le modèle actuellement accepté est illustré à la Figure 16. La photochimie primaire dans le PSII induit un transport d'électrons entre le PSII et PSI. Ce transport en le CDO et les PQH₂ crée un transport de protons du stroma vers le lumen du thylacoïde. La formation de ce gradient de protons permet l'activation de l'ATP synthétase (ATP Phosphohydrolase). La synthèse d'ATP s'effectue à partir d'adénosine diphosphate (ADP) et le phosphate inorganique (Pi) provenant du stroma du chloroplaste ($\text{ADP} + \text{Pi} + 4\text{H}^+ = \text{ATP}$) (Mitchell, 1974 ; Boyer, 1993). L'enzyme ATP synthétase est constituée de deux parties: la première (CF₀), hydrophobe qui permet le passage de protons de l'intérieur vers l'extérieur du thylacoïde. La deuxième partie (CF₁), hydrophile est constituée du site catalytique nécessaire pour la synthèse de l'ATP (Figure 17, Allen, 2002; Neslon et Ben-Shem, 2004, Lehninger et al. 1994).

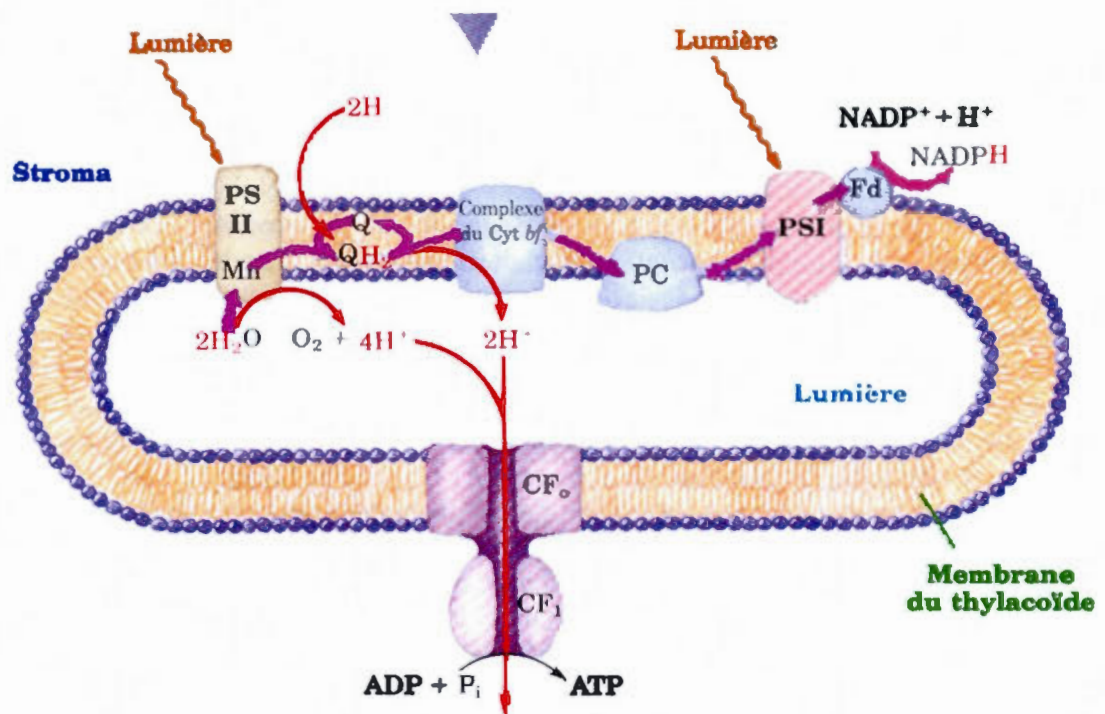
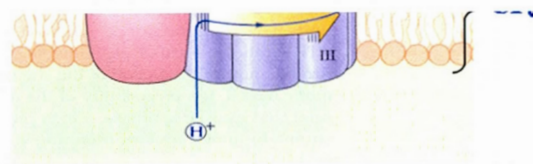
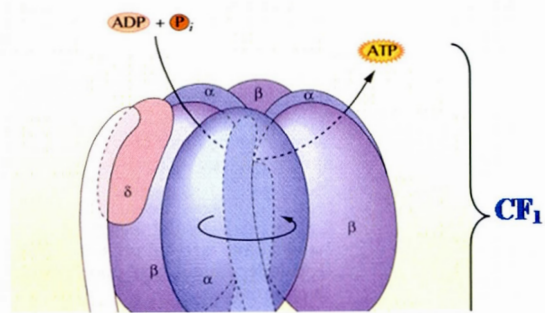


Figure 16: Modèle structurel d'un thylacoïde (d'après Lehninger et al. 1994) montrant le couplage "chimio-osmotique" entre le transport membranaire des électrons et la formation du gradient de protons transmembranaire permettant la synthèse de l'ATP (d'après Heller et al. 1998)



1.7 La régulation du transport transmembranaire des électrons

L'exposition à un ou plusieurs stress environnementales (ex : présence de métaux lourds, intensité lumineuse, herbicides) peut produire une photoinhibition de l'appareil photosynthétique. Dans cette situation, la capacité fonctionnelle des photosystèmes est réduite et l'excès d'énergie lumineuse accumulé peut être dissipé grâce à plusieurs mécanismes non dommageables pour l'organisme. Pour maintenir un fonctionnement optimal de la photosynthèse, un ensemble de mécanismes est utilisé afin de dissiper l'excès d'énergie absorbée par les photosystèmes (Critchley, 1998, 1999). La régulation de la chaîne de transport des électrons permet de maintenir un rendement optimal des photosystèmes. Les conditions exactes induisant l'activation de ces mécanismes de régulation sont encore à ce jour un sujet de recherche actuel (Malkin et Niyogi, 2000). Les trois mécanismes de dissipation de l'excès d'énergie, soit par la chaleur, la fluorescence et la formation d'espèce réactive de l'oxygène seront décrits par la suite.

1.7.1 Dissipation d'énergie sous forme de chaleur

La dissipation d'énergie sous forme de chaleur par les LHCII constitue la principale voie d'évacuation de l'énergie de façon non-photochimique et non dommageable pour le système (Horton et al 1994, 1996). Ce mécanisme est induit en présence d'une intensité lumineuse excessive. Il arrive aussi que ce mécanisme puisse s'activer lorsque la concentration de protons dans le lumen du thylacoïde est trop importante suite à un flux excessif d'électrons transmembranaires. La dissipation d'énergie sous forme de chaleur peut prendre différentes voies selon les conditions environnementales et les propriétés spécifiques à chaque espèce végétale (Demmig-Adams and Adams, 2006). Le mécanisme le plus important est le cycle des xanthophylles (Müller et al 2001). Durant ce cycle, l'enzyme violaxanthine dé-époxydase (violaxanthine:ascorbate oxydoréductase, EC 1.10.99.3) catalyse de façon

réversible la violaxanthine en zéaxanthine en deux étapes (Rockholm et Yamamoto, 1996) :

- 1) violaxanthine + ascorbate = anthéroxanthine + déhydroascorbate + H₂O
- 2) anthéroxanthine + ascorbate = zéaxanthine + déhydroascorbate + H₂O

Pour une représentation schématique du cycle des xanthophylles, voir la Figure 18.

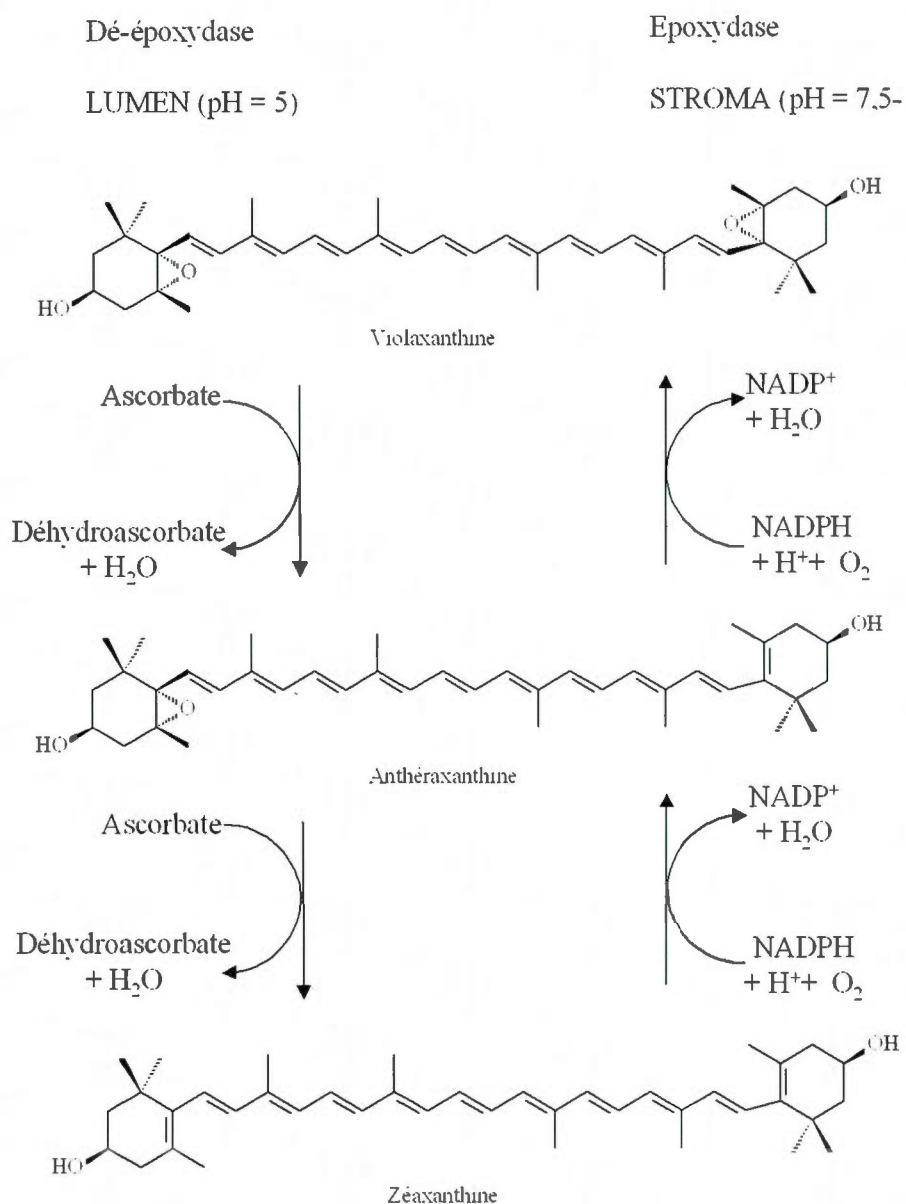


Figure 18: Cycle des xanthophylles lors de la régulation de la dissipation d'énergie lumineuse (d'après Müller et al. 2001)

La zéaxanthine est capable d'accepter directement l'énergie d'excitation des chlorophylles des LHCII afin de dissiper l'énergie captée sous forme de chaleur (Horton et al 1994; Demmig-Adams et al 1996). L'association de la zéaxanthine aux PSII s'effectue grâce à la participation de la protéine PsbS. Cette dissipation

d'énergie n'induit aucun transport linéaire des électrons, mais amplifierait le transport cyclique d'électrons dans le PSII. L'amplification du transport cyclique permettrait de protéger le PSII lors d'un excès de lumière (Poulson et al 1995) en impliquant le cytochrome b559 (figure 19). Il a été proposé que l'acidification de lumen suite à l'accumulation de protons entraîne un changement de conformation du PsbS. Ce changement conformationnel permet la liaison de zéaxanthine et la dissipation de l'énergie sous forme de chaleur (Niyogi et al 2004).

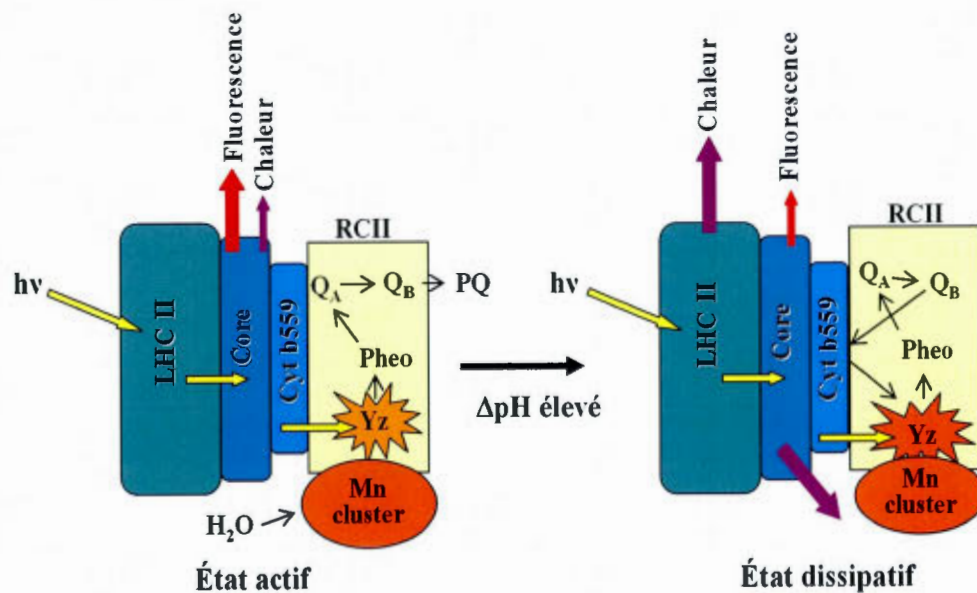


Figure 19: Changement structurel et fonctionnel du PSII suite à une augmentation excessive de proton dans le lumen et du transport cyclique d'électrons suite à une exposition à des intensités lumineuses excessives (schéma élaboré à partir de Critchley, 1998)

On retrouve aussi de la zéaxanthine sous forme libre à l'intérieur des membranes du thylacoïde. Elle agit dans ce cas comme antioxydant en protégeant les membranes thylacoïdiennes contre la peroxydation des lipides induites suite à la formation de ERO (Moronsito et al 2003).

1.8 Distribution de l'énergie entre les deux photosystèmes

Chez les algues vertes et les végétaux supérieures, le PSII et PSI ont des spectres d'absorption qui se chevauchent. Par contre, certaines longueurs d'ondes sont en mesure d'exciter préférentiellement le PSII ou le PSI. À l'aide de la spectroscopie d'absorption différentielle, il est possible de stimuler séparément les deux photosystèmes. Le PSII s'excitant à l'aide d'une lumière ayant un pic à 650 nm pour ou à 710 nm pour le PSI (Malkin et Niyogi, 2000). Dans l'environnement, les végétaux ne sont pas exposés de façon constante à la même intensité ni au même spectre lumineux occasionnant des changements structuraux et fonctionnels chez les PSII et PSI appelés états de transition. Cette variabilité modifie la proportion de l'énergie lumineuse captée par les PSII et PSI.

La modification de l'apport en lumière déséquilibre la relation entre le transport d'électrons et la distribution d'énergie absorbée par les PSII et PSI puisqu'ils ne fonctionnent pas à la même vitesse. Le processus d'état de transition permet d'ajuster à court terme la quantité de lumière absorbée par les PSII et PSI (Bellaïf et al. 2005 ; Kanervo et al. 2005). Le changement de l'état de transition I à l'état II permet d'optimiser le transport d'électrons entre le PSII et PSI en réduisant la quantité d'énergie captée par le PSII (Jupin et Lamant, 1999). Ce mécanisme induit une phosphorylation ou desphosphorylation des antennes collectrices de lumière.

La phosphorylation des polypeptides Lhcb1 et Lhcb2 du LHCII entraîne une diminution de la taille des antennes LHCII du PSII qui se déplace par la suite vers le PSI. La diminution de la taille du LHCII et par conséquent réduit l'énergie captée par le PSII (figure 20).

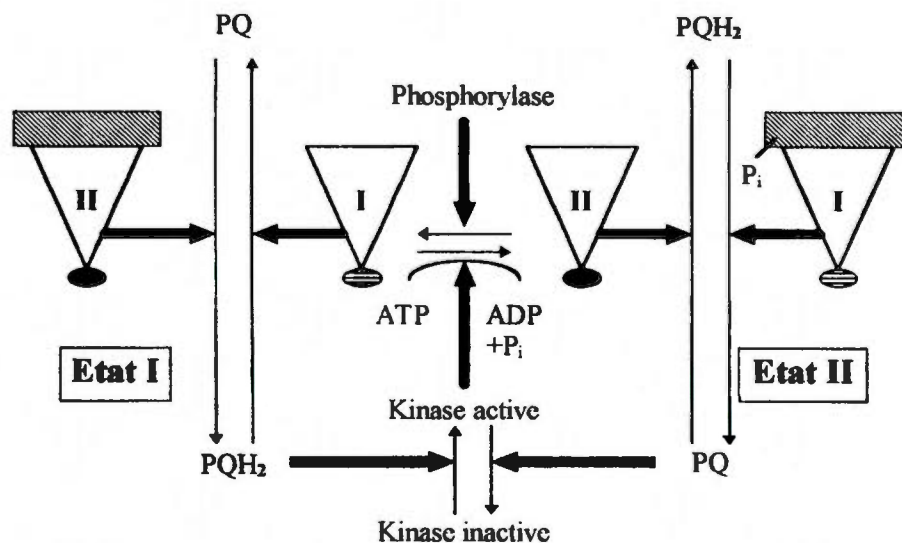


Figure 20: Schéma de la régulation des changements d'état I et II par l'induction de la phosphorylation des LHCII (Jupin et Lamant, 1999). Les rectangles achurés indiquent la proportion des LHCII mobiles

En résumé, l'état I est caractérisé par l'accroissement de la taille du LHCII du PSII et d'une diminution de celui du PSI, et inversement, l'état II indique une augmentation de la taille des antennes du PSI comparativement à celles du PSII. Lorsque que le PSII fonctionne plus rapidement que le PSI, on observe un grand rapport PQH₂/PQ causé par l'état réduit de la PQ. Dans le cas où le PSI fonctionne plus vite, la PQ se retrouve plus rapidement dans un état oxydé et le rapport PQH₂/PQ reste petit. La PQ réduite par le PSII induit l'activation d'une kinase qui, en présence d'ATP et de Mg²⁺, phosphoryle le LHCII (Jupin et Lamant, 1999).

1.9 Le rendement et la cinétique de la fluorescence chlorophyllienne des photosystèmes

L'absorption d'un photon par les pigments photosynthétiques n'est pas toujours entièrement convertie en énergie chimique. Une partie de cette énergie résiduelle peut être dissipée sous forme de chaleur et/ou de fluorescence. Lorsqu'une Chl capte un photon, elle passe d'un état stable à un état instable Chl* (état singulet) ayant un niveau d'énergie plus élevé. La Chl* redescend à son état stable de 3 façons différentes (comme décrits dans le chapitre 1.4.1; Stroch *et al.* 2004, figure 9):

1. Transfert l'énergie à une molécule de Chl voisine ou une molécule O₂ (formation de l'oxygène singulet).
2. Dissipation de cette énergie sous forme de chaleur.
3. Émission d'un photon sous forme de fluorescence.

La dissipation d'énergie sous forme de fluorescence a été découverte en 1931 par Kautsky et Hirsh. Suite à une adaptation à l'obscurité, les algues vertes émettaient de la fluorescence qui variait dans le temps sous une illumination continue. Cette intensité variable de la fluorescence est caractérisée par une cinétique très spécifique est appelée aujourd'hui «effet Kautsky ». Plusieurs stress physiologiques et facteurs environnementaux peuvent modifier la dissipation d'énergie par fluorescence en altérant son intensité en fonction du temps. L'analyse de l'émission de fluorescence est utilisée depuis environ soixante-dix ans comme outil permettant d'investiguer les réactions photochimiques et la chaîne de transport d'électrons associés au PSII et PSI. L'émission de la fluorescence provient essentiellement de la Chl *a* contenue dans les LHCII du PSII (Lazár, 1999). La mesure *in vivo* de l'émission de fluorescence par la Chl dépend de l'état d'oxydoréduction de Q_A. La réduction de Q_A cause une augmentation du niveau de la fluorescence et diminue lors de la ré-oxydation de celle-ci suite au transfert de l'électron vers Q_B (Duysens et Sweers,

1963; Papageorgiou, 1975)

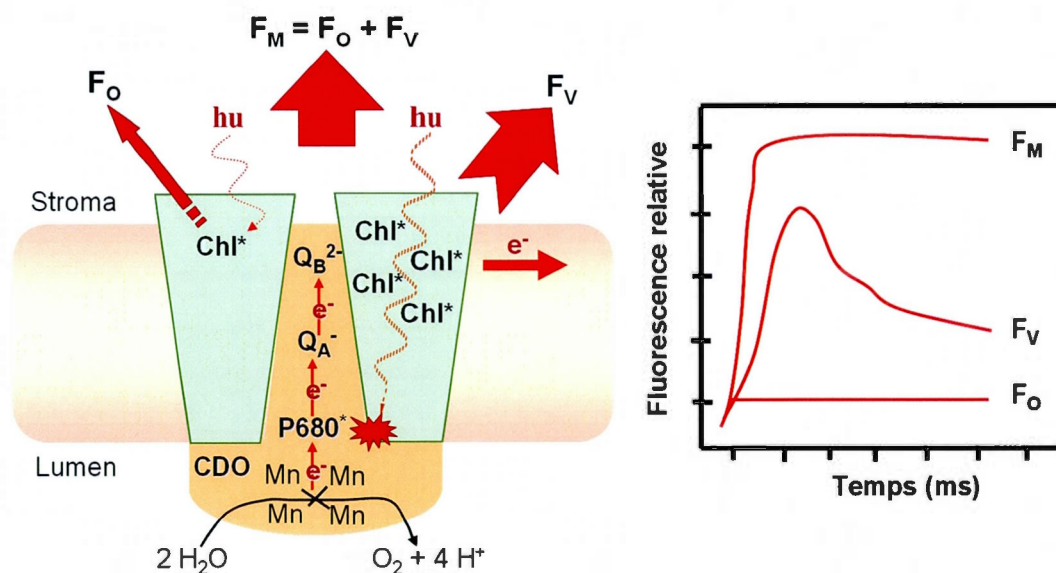
Comme vue précédemment, la dissipation d'énergie par la fluorescence est en compétition avec la dissipation d'énergie par les voies photochimiques et non-photochimiques. La diminution du transfert d'énergie vers la photochimie augmente la dissipation d'énergie via la fluorescence et la chaleur.

Le modèle de l'induction et de la cinétique de la fluorescence chlorophyllienne est le modèle de base permettant d'analyser et d'interpréter l'effet de la présence de xénobiotiques ainsi que de l'effet du stress sur l'état des réactions photochimiques du PSII vers le PSI au niveau moléculaire (Figure 21). Lorsque la Chl *a* absorbe un photon, elle devient dans un état instable ayant un haut niveau. Afin de revenir à son niveau d'énergie stable, la Chl peut soit transférer son énergie d'excitation à une molécule voisine de Chl, soit transférer au centre réactionnel du PSII, soit dissiper l'énergie sous forme de chaleur ou sous forme de fluorescence par l'émission d'un photon. Cette émission de photon (sous illumination constante) représente la fluorescence basale de l'appareil photosynthétique (F₀) aussi connue comme fluorescence non variable.

En présence d'une lumière saturante suite à une adaptation à l'obscurité, les accepteurs primaires des électrons Q_A du RC du PSII sont réduits. Cette réduction massive de Q_A permet d'évaluer la capacité photochimique maximale du PSII par un niveau de fluorescence maximal (F_M). Le rendement et la cinétique de la fluorescence chlorophyllienne peuvent donc être utilisés pour analyser l'activité du transport des électrons photosynthétiques associée aux autres processus biochimiques de la photosynthèse (Lazár, 1999, 2006).

En présence d'une source de lumière non saturante, les RC du PSII restent ouverts et la Q_A reste dans un état oxydée. Cet état d'oxydation de l'accepteur primaire des électrons reste stable tant que l'énergie d'excitation n'est pas suffisante pour être

transférée au RC et induire la séparation de charges. Une fois l'énergie d'excitation suffisante, le P680 devient activé en $P680^*$ et induit la séparation de charges. Un électron est alors transféré de $P680^*$ vers Q_A . Le centre réactionnel à l'état $P680^+$ est par la suite neutralisé par les électrons provenant du CDO. Le rendement de la fluorescence variable (F_V) émise par les LHCIIs va dépendre de l'état d'oxydoréduction de Q_A et de l'efficacité de la chaîne de transporteurs d'électrons entre le PSII et le PSI.



Dans le modèle présenté à la figure 21, l'énergie lumineuse ($h\nu$) est captée par les LHCIIs composés de Chl *a* (en vert). Le groupement protéique (en orange) est formé du CDO, du CR P680 ainsi que de Q_A et Q_B . Les flèches en rouge indiquent les sources possibles de dissipation de l'énergie captée soit sous forme photochimique (e^-) ou soit sous forme de fluorescence (F_O). En présence d'énergie suffisante pour induire la séparation de charges, l'état d'oxydoréduction de Q_A va induire la F_V , et

lorsque tout Q_A est réduit, il est possible d'évaluer F_M .

1.9.1 Principe de la cinétique rapide et polyphasique de la fluorescence chlorophyllienne

La méthode fluorimétrique du «*Plant Efficiency Analyzer*» (PEA) a été inventée afin d'analyser *in vivo* la cinétique rapide et polyphasique de la fluorescence chlorophyllienne. La cinétique rapide de fluorescence est obtenue suite à une adaptation à l'obscurité d'environ 30 minutes d'un échantillon suivie d'une exposition à une lumière saturante (d'environ 1 à 6 secondes). Cette fluorescence émise permet de suivre l'activité et le transport d'électrons dans le PSII suite à la photolyse de l'eau (Strasser *et al.* 1995; Strasser *et al.* 2004). Il est possible de suivre la réduction de Q_A par les électrons venant de la Pheo et de mesurer les variations de la fluorescence de F_0 jusqu'à F_m . La présentation des données recueillies sur une échelle logarithmique permet de visualiser cette cinétique polyphasique. En effet, cette cinétique rapide possède plusieurs transitions appelées: O, J, I et P (F_m), résultant des divers états d'oxydoréduction de la Q_A , Q_B et de la plastoquinone (figure 22). Strasser (1995) et Sušila (2004) ont démontré que le niveau de fluorescence de la transition O (F_0), avait une valeur constante durant les 50 premières microsecondes d'illumination (Strasser *et al.* 1995; Sušila *et al.* 2004). Les modifications observées du niveau de fluorescence sont directement liées à une altération des LHCII (Owens, 1996).

Les réactions photochimiques primaires dans le PSII causent l'apparition de la phase O-J. Cette phase est liée à une réduction des Q_A et à la fermeture graduelle des RC du PSII (Neubauer et Schreiber, 1987). Le niveau de fluorescence au point J représente la réduction maximale de Q_A ainsi que la fermeture complète des RC actifs. Des études ont rapporté qu'une inhibition des états de transition S dans le complexe de la photolyse de l'eau provoquerait l'inactivation du centre réactionnel

du PSII et par conséquent diminuerait la transition J suite à l'inhibition du transport d'électrons (Hsu, 1993; Strasser, 1997).

Par la suite, le niveau de fluorescence observé à la transition I correspond à la première réduction de Q_B par l'électron provenant de Q_A ($Q_A^- Q_B^-$; (Strasser *et al.* 1995). Suite à la transition I, le niveau de fluorescence montre, dans un premier temps, un plateau appelé «*dip*» qui indiquerait une régulation de la chaîne de transport d'électrons entre le PSII et le PSI (Hansen *et al.* 1991). L'augmentation par la suite de la fluorescence vers la transition P (phase I-P) est due à une accumulation progressive de $Q_A^- Q_B^{2-}$ (Strasser et Govindjee, 1991). La diminution du rendement de fluorescence après la transition P montre un effet de «*quenching*» photochimique. Cette diminution est causée par le transfert des électrons du PSII vers le PSI et le NADP⁺ (Krause et Weis, 1991, Walker, 1981) ainsi que l'oxydation rapide des Q_A . Cette diminution de la fluorescence produite est aussi influencée par la formation du gradient de protons qui entraîne une augmentation de la dissipation d'énergie sous forme de chaleur (Govindjee et Spilotro, 2002).

L'étude de la cinétique rapide de fluorescence chlorophyllienne a permis l'estimation de plusieurs paramètres connus comme étant des indicateurs du fonctionnement photochimique mais aussi de la dissipation d'énergie via le PSII. L'analyse de ces paramètres est basée sur le rendement de fluorescence des transitions O, J, et I, (50 μ sec, 2 ms et 30 ms respectivement). Le temps d'apparition de la transition P varie en fonction du temps et du transfert d'électrons entre le PSII et PSI (500 ms et plus).

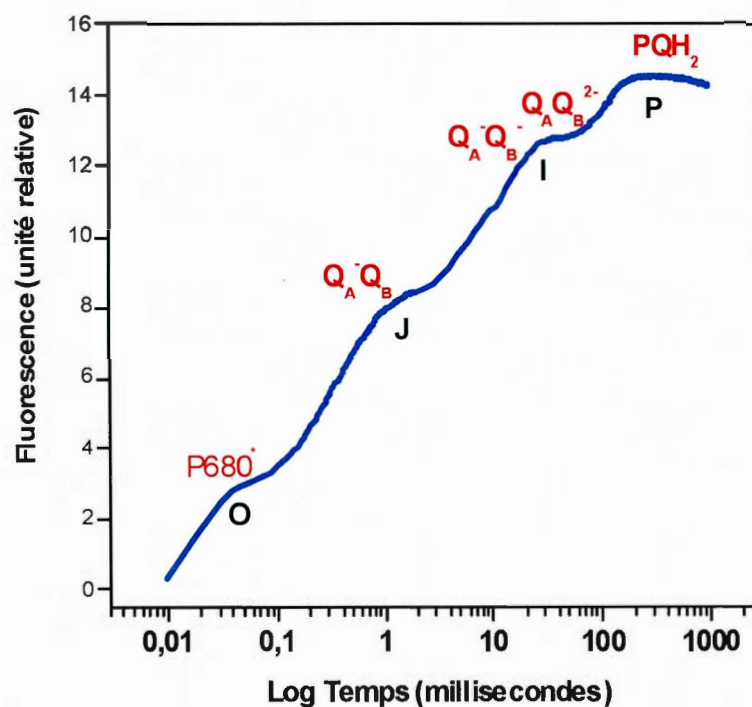


Figure 22: Cinétique rapide de fluorescence chlorophyllienne montrant les transitions O-J-I-P, mesurée sur une échelle de temps logarithmique. Les transitions O, J, I et P apparaissent respectivement à 50 μ s, 2 ms, 30 ms et approximativement à 300 ms. QA et QB sont les accepteurs primaires et secondaires du PSII; PQH₂ est la plastoquinone à l'état réduite (D'après Strasser et al. 1995).

1.9.1.1 Les paramètres photosynthétiques évalués à partir du rendement et de la cinétique rapide de fluorescence

Pour un échantillon adapté à obscurité, l'acquisition des transitions de la cinétique rapide de fluorescence permet d'estimer différents paramètres photosynthétiques associés à l'efficacité photochimique du PSII (figure 23).

- Le rendement de la réaction photochimique primaire du PSII:

$$\Phi_{MII} = (F_M - F_{50\mu sec}) / F_M \quad (\text{Strasser et al. 2004})$$

où $F_{50\mu s}$ est le niveau de fluorescence à 50 μs (transition O) lorsque les centres réactionnels du PSII sont ouverts et F_M le niveau de fluorescence maximal (à la transition P). Dans les conditions optimales, la valeur de Φ_{MII} est d'environ 0,8 chez les plantes supérieures (Björkman et Demmig, 1987).

- L'absorption de l'énergie lumineuse par les antennes collectrices de lumière (ABS) distribuée par centre réactionnel du PSII actif (RC):

$$ABS/RC = M_0 / V_J / \Phi_{MII} \quad (\text{Force et al. 2003})$$

où $M_0 = F_{300\mu sec} - F_{50msec} / (F_M - F_{50\mu sec}) \times 0.25$ représente la vitesse initiale de l'induction de la fluorescence variable. $V_J = F_{2msec} - F_{50\mu sec} / F_M - F_{50\mu sec}$ représente le taux de la réduction de Q_A .

- La quantité d'énergie lumineuse utilisée pour la séparation de charges du PSII (TR_0) par centre réactionnel actif RC représente le ratio :

$$TR_0 / RC = M_0 / V_J \quad (\text{Force et al. 2003})$$

- Le transfert des électrons de Q_A^- vers les transporteurs d'électrons au-delà de Q_A (ET_0) par centre réactionnel du PSII actif (RC) est le ratio:

$$ET_0 / RC = (M_0 / V_J) \times (1 - V_J) \quad (\text{Force } et \text{ al., 2003})$$

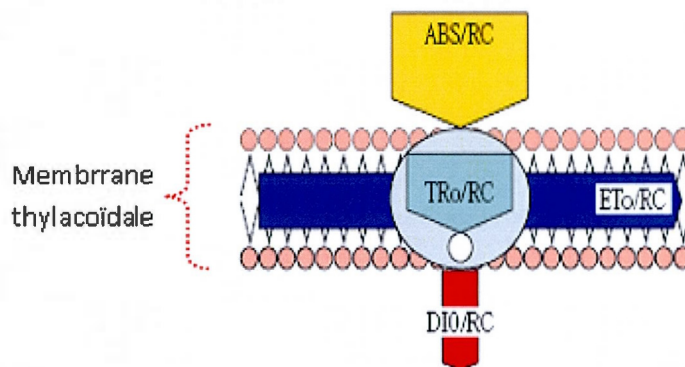


Figure 23 : Modèle de la membrane thylacoïdale indiquant les différents paramètres photosynthétiques qui caractérisent le fonctionnement du PSII .ABS/RC pour le LHCII, TR0/RC utilisée pour la séparation de charge , ET0/RC pour le transport d'électrons ou D10/RC pour la dissipation d'énergie sous forme de chaleur (d'après Zrýd et al., 2002).

1.9.2 Principe de la cinétique lente de la fluorescence chlorophyllienne

La méthode de *Pulse Amplitude Modulation* (PAM) a été développée dans le but d'être en mesure d'analyser la cinétique lente de la fluorescence chlorophyllienne. Elle permet d'évaluer la relation entre le rendement de la chaîne de transport d'électrons photosynthétiques du PSII vers le PSI et le rendement de fluorescence (Schreiber *et al.* 1986; Öquist et Chow, 1992; Schreiber, 2004). La fluorimétrie PAM est basée sur l'utilisation de quatre sources d'illumination (figure 24): une lumière analytique modulée (594 nm), une lumière actinique continue (400-700 nm), une lumière saturante (400-700 nm) et une lumière rouge lointaine (735 nm). L'utilisation de ces quatre types de lumière permet de mesurer la cinétique de fluorescence de la Chl *a* durant les diverses étapes de la photosynthèse.

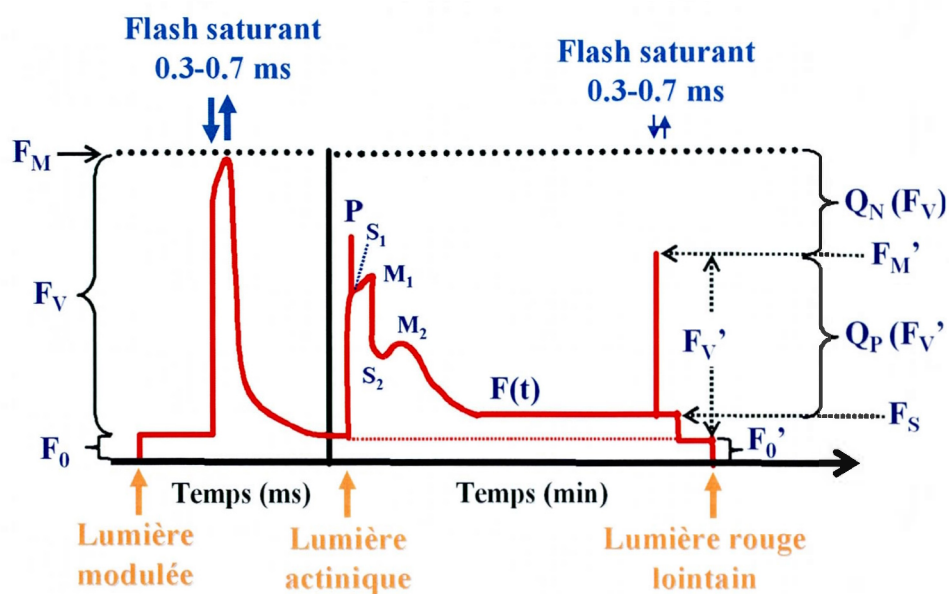


Figure 24: Cinétique de fluorescence modulée mesurée par la méthode PAM (schéma élaboré à partir de Schreiber et al. 1986). F_0 et F_0' : fluorescence de base pour une plante adaptée à l'obscurité ou à la lumière, F_V : fluorescence variable; F_M et F_M' : fluorescence maximale pour une plante adaptée à l'obscurité ou à la lumière, Q_N , «quenching» non photochimique; Q_P , «quenching» photochimique.

Une adaptation à l'obscurité d'environ quinze minutes permet d'obtenir un état où les transporteurs d'électrons des PSII et PSI sont complètement oxydés. L'algue est exposée à une lumière analytique modulée de faible intensité qui est insuffisante pour induire la séparation de charges dans le CDO. Sous cette illumination, il est possible de déterminer la constante de fluorescence F_O qui provient de la dissipation d'énergie sous forme de fluorescence émise par les LHCII. Ce phénomène se produit lorsque l'énergie d'excitation n'est pas transférée vers RC du PSII qui reste à l'état ouvert (non oxydé). L'application d'un flash saturant (300-700 ms) permet de déterminer le rendement maximal de l'appareil photosynthétique (F_M). Ce rendement est mesurable lorsque tous les RC sont fermés et que tous les Q_A ont été réduits. Ce niveau de fluorescence maximale est utilisé pour déterminer la fluorescence variable ($F_v = F_M - F_O$) comme indicateur de la capacité de transport d'électrons du PSII lors d'exposition à la lumière saturante. Le niveau de fluorescence maximale (F_M') est obtenu grâce à l'utilisation de façon périodique de flashes de lumière saturante (figure 24).

L'exposition à une lumière actinique active les processus photosynthétiques ce qui permet l'analyse de la cinétique de la fluorescence chlorophyllienne lente. La fluorescence induite suite à une illumination continue passe par différents états de transitions soit: P, S_1 , M_1 , S_2 et M_2) avant d'atteindre un niveau stable F_S . La fluorescence variable à l'état stationnaire ($F_{VS} = F_S - F_O$) permet d'évaluer la proportion de RC qui restent fermés chez une plante adaptée à la lumière continue (figure 24).

La fluorescence variable (F_v') est mesurée, une fois l'état stable de fluorescence F_S atteint, par l'utilisation de flashes de lumière saturante. F_v' correspond au rendement fonctionnel du PSII. Une fois l'état stationnaire de la chaîne de transport d'électrons atteint, la lumière actinique est fermée et la lumière dans le rouge lointain (à 735nm, excitant le PSI) est ouverte. L'utilisation de cette dernière source de lumière permet

l'oxydation complète de Q_A et d'estimer le niveau de fluorescence F_0' (Schreiber *et al.* 1986; Rohacek et Bartak, 1999)

Cette combinaison de diverses sources de lumière permet d'observer et d'analyser le rendement photochimique du PSII ainsi que la dissipation d'énergie sous forme non photochimique (Rohacek, 2002 ; Krause et Jahns, 2004). Le phénomène de «*quenching*» (Q_P) correspond à une diminution de la fluorescence qui peut être liée à la dissipation d'énergie *via* la réaction photochimique et *via* des réactions non photochimiques (Q_N , dissipation sous forme de chaleur) (figure 24, Schreiber, 2004).

1.9.2.1 Les paramètres photosynthétiques évalués à partir de la cinétique de fluorescence à l'état stationnaire.

La cinétique PAM permet l'estimation et l'analyse de divers paramètres photosynthétiques à partir d'un échantillon adapté à l'obscurité puis exposé à la lumière actinique. Ces paramètres peuvent nous indiquer l'efficacité de la chaîne de transport des électrons des PSII vers les PSI ainsi que la dissipation d'énergie par les voies non photochimiques (fluorescence et chaleur). La nomenclature des niveaux de fluorescence F_0 , F_M , F_V , F_0' , F_M' , F_V' et F_S est conventionnellement acceptée selon leur présentation à la Figure 24. Durant cette thèse, les paramètres suivants ont été observés et analysés :

- Le rendement photochimique maximal du PSII, Φ_{MII} :

$$\Phi_{MII} = (F_M - F_0) / F_M = F_V / F_M \quad (\text{Butler et Kitajima, 1975}).$$

où le rendement dépend de la réduction de Q_A suite au transfert des électrons du P680 (PSII)

- Le rendement photochimique des PSII ouverts, Φ'_{MII} :

$$\Phi'_{MII} = (F_M' - F_0') / F_M' = F_V' / F_M' \quad (\text{Genty et al. 1989}).$$

où le rendement photochimique du PSII est efficace lorsque l'algue est adaptée à la lumière. Φ'_{MII} est un indicateur des RC actifs du PSII participant à la photochimie et au transport d'électrons vers le PSI dans une plante adaptée à la lumière (Rohacek, 2002). D'après Kramer *et al.* (2004), il est possible de noter le paramètre Φ'_{MII} de la façon suivante: Y(II).

- La dissipation d'énergie sous forme non-photochimique non-régulée (Φ_{NO}), représente la dissipation d'énergie par les centres réactionnels fermés (non-fonctionnels) ou endommagés selon la formule suivante :

$$\Phi_{NO} = 1/((F_M - F'_M)/F'_M) + 1 + (((F'_M - F_S)/(F'_M - F'_O))[F'_O/F])(F_M/F_O - 1))$$

(Kramer et al. (2004))

Les paramètres de fluorescence Φ'_{MII} , Q_P , Q_N et Φ_{NO} permettent l'estimation de la contribution des voies de dissipation de l'énergie lumineuse absorbée par les LHCII des PSII. Des études ont rapporté que la présence dans l'environnement de mercure ($2,5\mu M$, Hg) chez les algues *Selenastrum capricornutum*, pouvait induire une diminution (d'environ 61%) du rendement photochimique opérationnel Φ'_{MII} . Cette inhibition est directement liée à une augmentation du paramètre Q_N qui augmente d'environ 500% (Juneau et Popovic, 2000). La dissipation de l'énergie lumineuse par la chaleur est fortement stimulée par le Hg chez ces algues. Des études similaires, chez les cyanobactéries *Spirulina platensis*, en présence d'une concentration de $20\mu M$ de Hg, ont observé par contre une diminution de la valeur de Q_P et de Q_N (Lu *et al.* 2000). La diminution de Q_N est signe d'une altération du système de régulation de la dissipation de l'énergie.

Chez *Chlamydomonas reinhardtii*, une exposition durant 24h au méthyle-mercure ($5\mu M$) entraîne une diminution du paramètre Q_P . Cette diminution de «quenching» photochimique serait liée à une augmentation du nombre de RC de PSII non fonctionnels ou endommagés (Kukarskikh *et al.* 2003). Chez les algues

Scenedesmus obliquus, une exposition de 12h aux métaux lourds tels que Cd, Cr, Ni, Cu, Ni et Zn entraîne une diminution des paramètres ϕ_{MII} et Q_P (Mallick et Mohn, 2003). La diminution de ϕ_{MII} serait due à une altération de la chaîne de transport d'électrons via le PSII vers le PSI qui aurait pour effet d'inhiber la réoxydation de Q_A . Cette fois-ci encore, la diminution de Q_P résulte de l'augmentation du nombre de RC du PSII non fonctionnels ou endommagés.

1.10 La chimie des espèces réactives de l'oxygène

La molécule d'oxygène à son état stable est biradicalaire. Elle possède deux électrons célibataires en spin parallèle sur sa couche électronique externe. Cette propriété rend l' O_2 inerte face aux molécules organiques possédant des électrons appariés et de spin opposé. Les radicaux libres provenant de l'oxygène ont comme caractéristique de posséder un seul électron célibataire sur leur couche électronique externe. Cette modification leur confère une grande réactivité envers les molécules biologiques (McKersie et Leschem, 1994). La terminologie «espèces réactives de l'oxygène» (ERO) inclut ici plusieurs différentes formes actives de l'oxygène, comprenant aussi les hydroperoxydes et les espèces radicalaires (tableau 1).

Nom commun	Configuration électronique	Terminologie
Oxygène triplet (état stable)	$\cdot\text{O}-\text{O}\cdot$	O_2
Oxygène singulet	$\text{O}-\text{O} :$	$^1\text{O}_2$
Radical superoxyde	$\cdot\text{O}-\text{O} :$	$\cdot\text{O}_2^-$
Radical hydroperoxyde	$\cdot\text{O}-\text{O}:\text{H}$	$\cdot\text{OOH}$
Peroxyde d'hydrogène	$\text{H}:\text{O}-\text{O}:\text{H}$	H_2O_2
Radical hydroxyle	$\text{H}:\text{O}\cdot$	$\cdot\text{OH}$
Ion hydroxyle	$\text{H}:\text{O} :$	OH^-

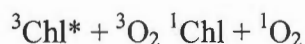
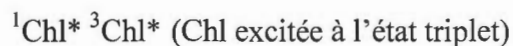
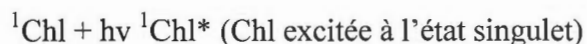
Tableau 1 : Nomenclature des différentes formes des espèces réactives de l'oxygène (Dat et al., 2000, McKersie et Leshem, 1994).

1.10.1 La chimie des espèces réactives de l'oxygène

La formation des ERO, dans la cellule végétale, se produit principalement dans les organites cellulaires suivants : chloroplaste, mitochondrie, réticulum endoplasmique, peroxysomes et paroi cellulaire (Apel et Hirt, 2004). La respiration cellulaire à l'intérieur des mitochondries est responsable à elle seule d'une grande production ERO. En effet, lors de la respiration cellulaire, l'oxygène est utilisé comme accepteur terminal des électrons pour la formation d'un gradient de protons intermembranaires qui est, comme dans le cas du chloroplaste, nécessaire à la synthèse d'ATP. Plusieurs mécanismes cellulaires sont présents dans la mitochondrie afin d'éliminer rapidement ces ERO. Cependant la présence de xénobiotiques tels les métaux lourds et les herbicides peut occasionner une altération de ce processus et induire l'accumulation des EROs (Apel et Hirt, 2004).

Deux mécanismes principaux sont liés à la formation de ERO dans l'appareil photosynthétique végétale: soit lors de l'absorption de lumière ou en présence de métaux lourds.

Suite à l'absorption d'un photon par les LHCII excédant la capacité de dissipation d'énergie la chlorophylle excitée $^1\text{Chl}^*$ passe à l'état triplet ($^3\text{Chl}^*$). Cette molécule de Chl super-chargée peut ensuite transmettre son énergie à l'oxygène ce qui a pour effet de former une molécule d'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) selon les étapes suivantes :



Les LHCII sous illumination intense peuvent être une source importante de la formation des ERO (Figure 25, Nishiyama et al. 2006). La production d'oxygène singulet dans le PSII est due à une haute intensité lumineuse ou suite à l'inhibition de la chaîne de transport d'électrons par divers xénobiotiques environnementaux (Niyogi, 1999).

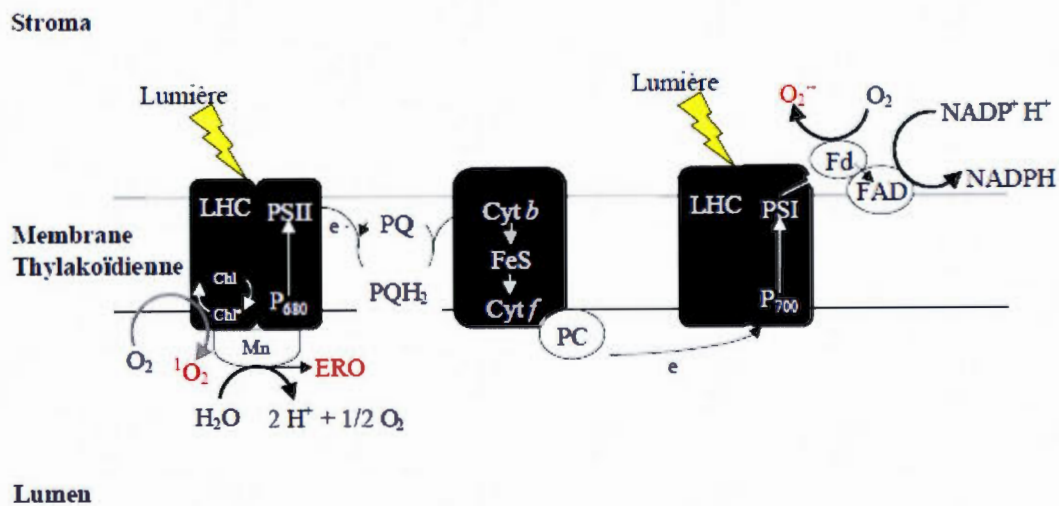


Figure 25: Sites de formation d'ERO pendant la photosynthèse et le transport des électrons entre le PSII et PSI (d'après Asada, 1994; McKersie et Leshem, 1994).

Le second mécanisme de la formation d'ERO est lié à la présence de différents xénobiotiques tels que: les métaux lourds (Fe, le Cd, le Hg et le Cu). Ces métaux sont en mesure de réduire l'O₂ pour former des radicaux libres et des hydroperoxydes (Prasad et Dietz, 1999; Dat *et al.* 2000).

Les métaux lourds (ex : le Cd, le Cu et le Cr) peuvent induire un stress oxydatif entraînant une lipoperoxydation, un décoloration des feuilles due à la diminution du taux de chlorophylle (la chlorose) ainsi qu'une diminution de la croissance (Drazkiewicz *et al.* 2004, Pandey *et al.* 2005, Smeets *et al.* 2005).

1.11 La fixation du CO₂ et la synthèse de glucides

La photosynthèse a pour but chez les végétaux de permettre la fixation du CO₂ pour permettre la synthèse des sucres. Durant l'activité photosynthétique du PSII et I, le CO₂ atmosphérique est capté puis assimilé dans le stroma du chloroplaste pour être fixé par la suite en glucide durant le cycle de Calvin. L'ATP et en NADPH produit durant le transport des électrons et grâce formation du gradient de protons transmembranaires (Heineke, 2001) est nécessaire durant ce cycle. La fixation du CO₂ dans le stroma du chloroplaste durant le cycle de Calvin s'effectue en trois étapes (figure 26).

La première étape se caractérise par la fixation du CO₂ par ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase (3-phospho-D-glycérate carboxylase, EC 4.1.1.39; Bowles *et al.* 1971) via la ribulose-1,5-biphosphate carboxylase (désignée par Rubisco). Cette réaction permet la synthèse du 3-phosphoglycérates (PGA). Durant la deuxième étape, le PGA est réduit en triose phosphate (3-phosphoglyceraldéhyde) puis exporté dans le cytosol pour être transformé en sucrose. La troisième étape du cycle de Calvin est caractérisée par la régénération de la ribulose 1,5-bisphosphate (Martin *et al.*, 2000 ; Raines, 2003).

Le bilan de la fixation du CO_2 durant le cycle de Calvin est la formation d'un triose-phosphate. Durant ce cycle, 6 molécules d'ATP sont utilisées lors de la phosphorylation du PGA ainsi que trois autres lors de la régénération du ribulose 1,5-biphosphate. La réaction globale pour synthétiser une molécule de sucrose est:

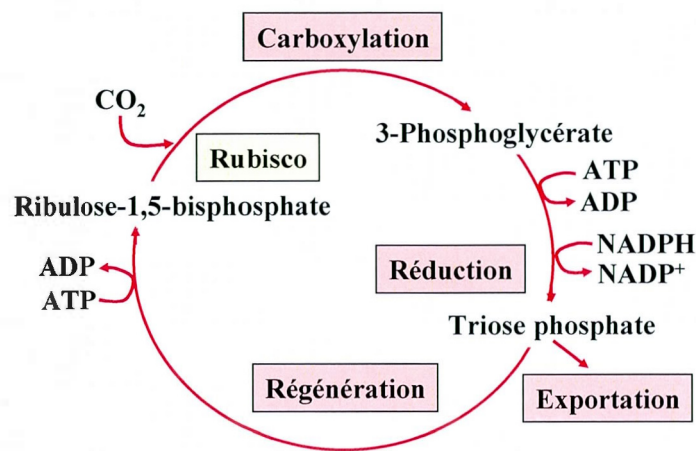


Figure 26: Les réactions biochimiques de la fixation du CO_2 lors du cycle de Calvin (d'après Heineke, 2001).

1.12 Le cycle cellulaire

La perpétuation de la vie repose essentiellement sur la reproduction cellulaire, ou division cellulaire (Dewitte and Murray 2003). Les eucaryotes, contrairement au procaryote, possède une grande quantité génétique. Leur ADN est organisé en structures appelés chromosome pouvant atteindre plusieurs mètres de long. La duplication et la répartition aux cellules filles cette ADN (Dewitte et Murray, 2003) est assuré par le cycle cellulaire. Le génome de chaque cellule diploïde contient deux chromosomes homologues (ayant les mêmes fonctions) appelés N. le nombre de chromosomes diffère d'une espèce à l'autre cependant la structure des chromosomes est semblable chez la plupart des eucaryotes. Elle est formée de deux chromatides sœurs liées entre elles par un centromère (figure 27).

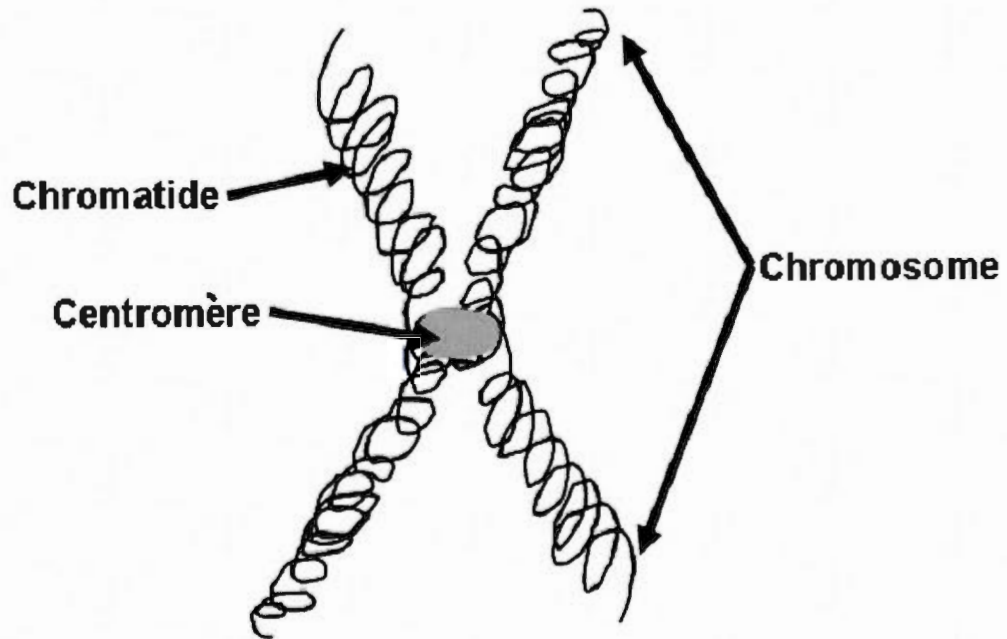


Figure 27: Structure d'un chromosome, formée de 2 chromatides sœurs et liée par le centromère (inspiré de Dewitte et Murray, 2003)

1.12.1 Les étapes du cycle cellulaire

Les étapes du cycle cellulaire ont été définies par rapport aux événements majeurs soit: la synthèse de l'ADN et la division cellulaire. Chez les cellules eucaryotes, le cycle cellulaire est composé essentiellement de cinq phases (figure 28). Ces phases sont composées de phases de croissance (G) de synthèse (S) et finalement de la mitose (M). On appelle les diverses phases du cycle G_0 , G_1 , S, G_2 et M. La phase G_0 ne fait pas partie du cycle de division cellulaire. Cette phase est dite «quiescence», ce qui veut dire que la cellule rentre dans une phase de repos et aucune division cellulaire ne se produit. Ces cellules en G_0 peuvent, retourner au cycle cellulaire et ré-initier la progression dans le cycle pour la prolifération cellulaire. La phase de croissance 1 (G_1) est caractérisée par une intense activité métabolique ayant pour but de synthétiser de grandes quantités de protéines, de glucides et de réserves d'énergie suffisante pour permettre le passage d'un cycle de division cellulaire (Hagiwara et al. 2002). La synthèse des protéines spécifiques à la division cellulaire s'effectue durant la phase G_1 . Une fois cette synthèse terminée, la cellule débute la phase S. Cette phase est caractérisée par l'ensemble de la réplication (synthèse) de tout le contenu génétique (ADN) de la cellule et de ses organites (figure 28). Durant cette phase la quantité d'ADN dans la cellule passera graduellement de $2N$ à $4N$ (Farinas et al. 2006). Une fois l'ensemble de l'ADN synthétisé, la cellule passe alors dans la phase de croissance 2 (G_2) durant laquelle un système de contrôle vérifiera la transcription de l'ADN. Durant cette phase la cellule effectue la duplication de ses organites (ex : mitochondrie, chloroplaste, et photosystème. Figure 28). Finalement, une fois le contrôle de la duplication de l'ADN effectué, la cellule entre en mitose (M) afin de se diviser en cellules filles. La mitose est composée de cinq phases : prophase, prométaphase, métaphase, l'anaphase et la télophase (figure 28). Elles sont un ensemble de changements ininterrompus comprenant la disparition de la membrane nucléaire, la migration des chromosomes

aux pôles, de la formation du sillon de division et de la dissociation entre les cellules filles. Chez les algues, l'appareil photosynthétique est opérationnel une fois la division cellulaire complétée.

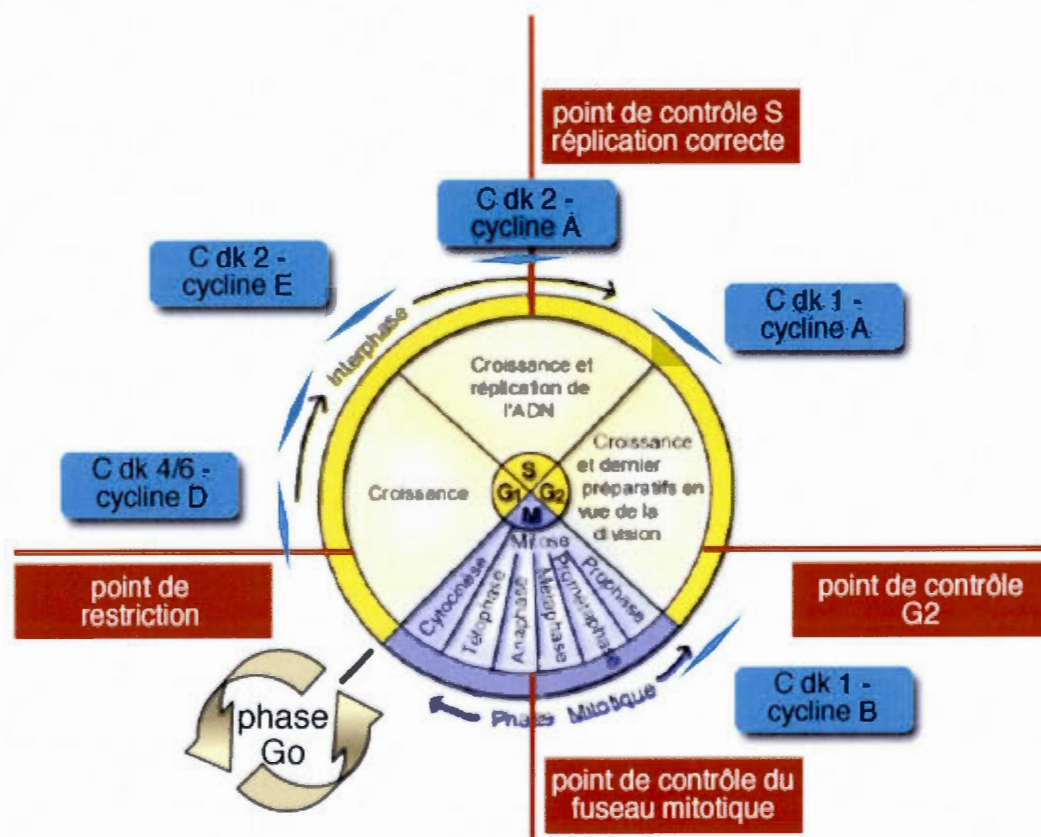


Figure 28: Schématisation des diverses phases du cycle cellulaire (inspiré de Farinas et al. 2006)

La régulation du fonctionnement du cycle cellulaire, chez les cellules eucaryotes, repose essentiellement sur deux types de protéines de structure complémentaire que l'on nomme: Cdk (*Cycline-dependent kinase*) et cycline. La Cdk est la molécule essentielle au déroulement du cycle cellulaire et est activée grâce à la liaison d'une cycline spécifique. La liaison Cdk-Cycline forme un complexe hétéro-dimérique. Une Cdk peut être en mesure de s'associer à plusieurs cyclines différentes et inversement une cycline peut activer différentes Cdk (Vandepoele et al. 2002).

Durant les phases du cycle cellulaire, un ou plusieurs complexes Cdk-cycline sont nécessaires afin d'activer les processus métaboliques essentiels à la poursuite du cycle (Huntley et Murray, 1999). L'activité des cyclines sont régulées par de nombreuses kinases et phosphatases possédant une capacité d'activation ou d'inhibition (Farinas et al. 2006).

1.12.2 Transition des phases du cycle cellulaire

Le contrôle du cycle cellulaire est effectué par les complexes Cdk-cyclines. Divers complexes sont nécessaires à différentes phases du cycle. Nous allons voir par la suite les diverses Cdk et cyclines généralement impliquées dans le passage des phases du cycle cellulaire dans les cellules eucaryotes.

La transition de G_0 à G_1 :

L'activation du processus de division cellulaire s'effectue par le passage des cellules en quiescence vers la phase de croissance 1 (G_1). Ce processus est stimulé par deux voies de signalisation :

1. Activation de la transcription de gènes tels que Cycline D et Cdk4 et 6 dus à l'activation de cascades de Map kinase (MapKKK/MapKK/MapK).
2. Activation de la transcription des gènes de Cdk4, Cdk6, Cycline D et Cycline E par un dimère de Myc et Max.

Durant la phase G_1 , l'activation de la transcription des cyclines D et E est initiée. Ces cyclines permettent l'activation du gène E_2F qui est responsable du passage du cycle cellulaire vers la phase S.

Passage de G₁ à S

Ce passage est sous le contrôle de plusieurs protéines : Rb, E₂F, Cdk2, Cdk4. Durant la phase G₁, la protéine Rb est non phosphorylée et sa liaison avec E₂F empêche l'activation de cette dernière. La formation du complexe cycline D/Cdk4 et cycline E/Cdk2 permet la phosphorylation de Rb (4 sites de phosphorylation) ce qui libère E₂F. Une fois libre, E₂F se lie avec la protéine DP et ils agissent comme facteur d'activation de la transcription, permettant la progression vers la phase S.

Passage de la phase G₂ à M

Le passage entre la phase de croissance 2 et la mitose est régulé par le complexe Cdk1-Cycline B. La formation du complexe Cdk1-Cycline B permet l'ouverture du site ATPasique de Cdk1. L'activation du complexe ATPasique permet d'activer une série de modifications structurales permettant ultimement d'activer la protéine MPF. L'activation de cette protéine initie le passage vers la phase mitotique du cycle cellulaire

Des études ont rapporté qu'il est possible grâce à des cycles d'illumination, de synchroniser le cycle cellulaire sur la presque totalité d'une population d'algues (Spudich and Sager 1980; McAteer *et al.* 1985; Yee and Bartholomew, 1988; Suzuki *et al.* 1994; Jacquet 2001; Bisova *et al.* 2005). De plus, il a démontré que la lumière est essentielle pour induire la croissance de cellules mais que la division cellulaire elle-même est indépendante de la période d'illumination. Les algues ont besoin d'un seuil minimal d'absorption photonique afin de pouvoir progresser dans le cycle cellulaire (Farinas *et al.* 2006). L'utilisation de diverses périodes d'illumination a permis d'être en mesure d'analyser et de comparer l'effet de ce synchronisme sur la photochimie d'une population (Kaftan *et al.* 1999, Farinas *et al.* 2006, Strasser 1999).

CHAPITRE II

PROJET DE RECHERCHE : ALTÉRATION DE LA SENSIBILITÉ AUX EFFETS TOXIQUES DE XÉNOBIOTIQUES AINSI QUE DE L'ACTIVITÉ PHOTOCHEMIE DE LA PHOTOSYNTHESE DURANT LE CYCLE CELLULAIRE

2.1 LES PROBLÉMATIQUES SPÉCIFIQUES ET LES OBJECTIFS DE RECHERCHE RÉALISÉS

Notre projet de recherche est constitué de trois parties. La première partie consiste à étudier l'influence du cycle cellulaire sur l'activité photochimique de la photosynthèse durant les diverses phases du cycle cellulaire. Durant cette partie, les algues ont été cultivées sous diverses périodes d'illumination, soit un cycle de 16h de lumière suivi de 8h de noirceur ou soit à une illumination continue. La croissance des algues sous diverses périodes d'illumination a servi à synchroniser le cycle cellulaire de la communauté. La problématique consiste à développer une méthode de détection et d'analyse des diverses phases du cycle cellulaire ainsi que la variation de cette synchronisation à travers le temps. De plus, nous avons analysées les variations du rendement de fluorescence, la capacité photochimique et la dissipation d'énergie sous forme non photochimique afin d'établir quel était l'impact des diverses phases du cycle cellulaire sur la photochimie. Dans un premier rapport présenté au chapitre III, l'analyse des états du cycle cellulaire et de son impact sur la photosynthèse durant diverses périodes d'illumination a été étudiée. L'identification des phases du cycle cellulaire a été réalisée par fluorimétrie grâce à la cytométrie en flux. L'analyse de l'impact sur la photochimie a été par la suite réalisée à l'aide de plusieurs paramètres photosynthétiques tels qu'ABS/RC, ETo/RC, Tro/RC ainsi que l'influence de la lumière sur la synthèse de la Chl et des caroténoïdes.

Actuellement, l'impact du cycle cellulaire sur la photosynthèse nécessite une recherche fondamentale plus approfondie. À notre connaissance, l'identification précise des phases du cycle cellulaire et de leurs impacts sur la photosynthèse n'ont pas été étudiés. L'utilisation d'un cycle de lumière 16h/8h va permettre l'amplification des phases cellulaires G_2/M . Cette amplification va permettre l'analyse de la photosynthèse en fin du cycle cellulaire et de la comparer à l'état de celle-ci durant la phase G_0/G_1 ou lorsqu'exposé en lumière continue. Les altérations structurelles et fonctionnelles de l'appareil photosynthétique causées par le cycle cellulaire vont se refléter sur le rendement et la cinétique de fluorescence permettant une interprétation des processus photochimiques et du transport des électrons dans la photosynthèse. La réalisation de cette recherche va permettre une meilleure compréhension de la relation entre le cycle cellulaire et les changements observés du rendement photochimique du PSII.

Dans la deuxième partie de ce travail, la problématique a consisté à investiguer et interpréter l'impact du cycle cellulaire et du cycle d'illumination sur la toxicité du dichromate. Dans cette problématique au chapitre IV, l'étude du rendement quantique du transfert des électrons du P680 à l'accepteur Q_A et le rendement photochimique du PSII quand la plante est adaptée à la lumière ont été réalisés. Les résultats de cette étude ont permis l'élaboration d'une théorie sur l'effet du cycle cellulaire sur la toxicité de xénobiotique tel que le dichromate. Par cette approche méthodologique, il a donc été possible d'évaluer la toxicité du chrome lors d'exposition à divers moments durant le cycle cellulaire et ainsi élaborer une théorie de l'impact d'un déversement de chrome à divers moments dans l'environnement.

Pour cette problématique, l'utilisation de plusieurs types de cycle d'illumination a permis de comparer les résultats obtenus sur la toxicité du chrome. Il a été possible d'émettre des hypothèses sur la variabilité des résultats expérimentaux obtenus dans diverses études suite à l'exposition au chrome. Il a été observé que les algues

croissant sous un régime de lumière alternant entre lumière et noirceur sont beaucoup plus sensibles que celles poussant en lumière continue (Perreault et al. 2009). Grâce à l'objectif précédent, il a été possible de mesurer l'effet de chaque phase du cycle sur l'inhibition de la photosynthèse causé par la présence du dichromate.

Dans la troisième partie de ce travail au chapitre V, la problématique étudiée a consisté à investiguer et interpréter l'impact du cycle cellulaire et du cycle d'illumination sur la toxicité de l'atrazine. Dans cette problématique, l'analyse de l'impact de l'atrazine à divers moments durant le cycle cellulaire sur la photochimie a été réalisé à l'aide des plusieurs paramètres photosynthétiques tel qu'ABS/RC, ETo/RC, TRo/RC ainsi que sur le rendement quantique du transfert des électrons du P680 à l'accepteur Q_A ainsi que sur la dissipation d'énergie non-photochimique, non régulée (Φ_{NO}). Notre étude, par une approche multiparamétrique, a permis de mieux comprendre la variation de la toxicité en la présence de l'atrazine selon le cycle d'illumination utilisé et de son impact sur l'environnement. Les altérations structurelles et fonctionnelles de l'appareil photosynthétique dues au cycle cellulaire vont se refléter sur le rendement et la cinétique de fluorescence mais aussi sur la toxicité de xénobiotique. Grâce à l'identification des phases du cycle cellulaire, nous avons été en mesure d'identifier celles plus sensibles à la présence de xénobiotique.

L'objectif de recherche a permis d'analyser grâce à l'utilisation de divers paramètres photosynthétiques l'influence que le cycle cellulaire peut avoir sur la photosynthèse mais aussi sur la toxicité de xénobiotiques environnementaux. L'utilisation de cycles de lumière ou d'une illumination constante a permis d'évaluer la différence de toxicité de ces xénobiotiques afin de déterminer les critères méthodologiques nécessaires pour effectuer un bioessai qui utilise la photosynthèse comme un indicateur de toxicité des xénobiotiques.

CHAPITRE III

CHANGE OF PHOTOSYSTEM II ACTIVITY OF *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* IN SYNCHRONIZED AND ASYNCHRONIZED CELL CYCLE CULTURE

Olivier Didur, François Perreault, Abdallah Oukarroum, David Dewez, Radovan Popovic*

Department of Chemistry, University of Quebec in Montreal. C.P. 8888, Succ. Centre-Ville, Montreal. Quebec, H3C 3P8 Canada.

* Corresponding author: Radovan Popovic, email: popovic.radovan@uqam.ca.

Phone number: 514-987-3000, ext. #8467. Fax: 514-987-4054

3.1 Résumé

L'activité du photosystème II chez l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* a été étudiée au cours des différentes phases du cycle cellulaire (G_0/G_1 , S et G_2/M). Les algues ont été maintenues en phase de croissance exponentielle sous une illumination constante ou sous un cycle de 16h de lumière/8h de noirceur afin d'obtenir des populations algues homogènes. La cytométrie en flux a été utilisée afin de déterminer les états du cycle cellulaire de la population à travers le temps. L'activité du photosystème II a été analysée à l'aide de la méthode du PEA pour obtenir les paramètres de fluorescence suivant : la taille des antennes réceptrices de lumière (ABS/RC), la captation des électrons par centre réactionnel (TRo/RC) et la chaîne de transport des électrons par centre réactionnel (ETo/RC). Les résultats obtenus indiquent une réduction accrue d'ABS/RC combinée à une réduction de TRo/RC et ETo/RC durant la phase G_2/M . Ces résultats ont été utilisés pour mieux comprendre l'effet de la présence du cycle cellulaire sur les propriétés fonctionnelles et structurales du photosystème II pendant la croissance des algues. Cette étude pourrait expliquer la fréquente variabilité des résultats obtenus en utilisant des cultures d'algues dans un état du cycle cellulaire inconnu.

3.2 Abstract

The photosystem II activity of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* was investigated during the different states as G₀/G₁, S and G₂/M of the cell cycle. Algae growth was maintained under continues light or light/dark cycle (16h/8h) to obtain homogenize cell cycle and flow cytometry method was used to determine the cycle state of alga population. Photosystem II activity was investigated by using fluorescence parameters indicating Photosystem II antenna size, electron trapping per reaction center, electrons transfers per reaction center with Plant Efficiency Analyzer methods. Our results indicated a reduction of the ABS/RC combined with a reduction of the Eto/RC and Tro/RC during the G₂/M cell cycle phase. These results were used to interpret the dependency of Photosystem II functional and structural properties during the cell cycle phase during the algae growth. Such study may explain frequent variability of results obtained by using algae cultures in regardless to cell cycle state.

Keywords: green alga, synchronization of cell division, cell cycle, chlorophyll fluorescence, photosynthesis, *Chlamydomonas reinhardtii*.

3.3 Introduction

In green algae, cell division is regulated by different mechanisms highly conserved throughout evolution (Dewitte and Murray 2003). The cellular division process in microorganisms, known as mitosis, is composed of different states which are synchronized as a cycle. This process has been found to be composed of the four following transition states named as G_1 , S, G_2 and M phases. The mitosis process begins with the initiation of the G_1 state characterized by intensive metabolite process leading to increase of proteins and carbohydrates synthesis (Hagiwara et al. 2002). The G_1 growth state is followed by the S phase showing DNA synthesis. This state is initiated by the condensation of the nuclear DNA into the chromosome structure. The end of duplication of the DNA content leads to the second growth state (G_2) where there is the control of the replication of all DNA before the initiation of the last state named as M phase leading to cell division (Figure 1). Therefore, algal cell mitosis will lead to the creation of daughter cells with complete functional cellular systems. Priory exposure to light appears to be necessary to trigger the beginning of G_1 state leading to the initiation of mitosis process in algae (Hagiwara et al. 2002). During those processes associated with mitosis, the photosynthetic apparatus can pass through different transformation. It has been shown that during the G_1 phase there is an increase of phosphorylation of thylakoid membrane (Hagiwara et al. 2002). Thylakoid phosphorylation is known to be part of the process which involves the antenna complexes synthesis and repair of PSII active reaction center (Heil and Senger 1986; Kaftan 1999).

The determination of those specific states during algal cell cycle can be done by the evaluation of DNA quantity inside the nucleus. The amount of DNA found in each cell during the cycle vary considerably form the G_1 , S, G_2 and M phases. In the G_1 phase the quantity of DNA is equal to the double numbers of chromosome ($2n$) and during the S phase the quantity will increase from $2n$ to $4n$. Therefore using this

method, we distinguish the G₂ and M phases since both have are characterized with the same amount of DNA (4n) (Farinas 2006).

The unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* has been widely used in the past as a model experimental system to study many aspects of cellular and biochemical mechanisms. The reason for this is that this green alga provides many advantages to work in the laboratory conditions. This alga can be easily manipulated in the laboratory with a rapid growth and minimal nutritional requirements. The vegetative cell cycle is very simple in which cells stay in haploid state. This cell cycle is regulated by a circadian clock. After dark adaptation, algal culture of *C. reinhardtii* exposed to light regime pass through different synchronized state of mitosis which affected photosynthesis function (Harris 1998).

Algal culture synchronization using light/dark cycles has been used in the past for many green algae such as *Chlamydomonas*, *Chlorella*, *Euglena* and others picoeukaryotes algae (Spudich and Sager 1980; McAteer et al. 1985; Yee and Bartholomew, 1988; Suzuki et al. 1994; Jacquet 2001; Bisova et al. 2005). Studies have shown that, although light was an absolute requirement to induce cell growth, cellular division itself was independent of illumination when algal cells has reached its minimal threshold value, but a progressive increase of the illumination period was shown to induce an increase of the cell cycle division (Farinas et al. 2006). For the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*, algal cells are dividing once per day and cytokinesis is beginning at the time of the light-dark transition. A cycle of 16/8 hours (light/dark) was used to amplify the G₂/M phase compared to 8/16 or 12/12 hours light/dark cycles. By using that cycle condition, we were able to obtain nearly half of the population as active in cell division (Farinas et al. 2006).

When algal cells are passing through mitosis, a change in the light regime can modify the duration of the cell cycle phases. The population of algal culture during those states of the cell cycle will have heterogeneous composition. Therefore, a

change in the light regime will affect algal cell division and photosynthetic processes related to functional and structural properties of the photosystem II. Indeed, it has been shown that the photosynthetic activity of synchronous grown of cells culture may vary during different light regime (Strasser 1999). By using different light regime (duration of light and dark), it is possible to modify the cell community distribution within the G₁, S, G₂ and M states. Heterogeneous population of algal culture will cause a problem of reproducibility for different experimental research setup such as toxicological investigation. In this study, we attempt to determine the dependence between the cell cycle phases under different light regime and the photosystem II activity using the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*.

3.4 Materials and methods

3.4.1 Algal culture

The wild-type strain CC-125 of the green algae *Chlamydomonas reinhardtii* was obtained from the *Chlamydomonas* Genetic Center (Duke University, Durham, NC). Algal cells were growing on batch culture of 100 ml of high salt medium (HSM, ref. Harris 1989) under continuous illumination ($100 \pm 25 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) continuous or with light/dark cycle of 16/8 hours. Light irradiance was provided by white fluorescent lamps (Sylvania GroLux F 36 W) and the temperature was set at $27 \pm 1^\circ\text{C}$. The algal culture was placed on an orbital shaker (120 rpm) and permanently aerated to maintain constant CO_2 supply for the growing medium. When the algal culture was in the exponential growth phase, a sample having a cell density of 5×10^7 cells ml^{-1} was used for different analytical methodologies.

3.4.2 Cell growth and chlorophyll determination

Algal cell density was determined by using a Multisizer 3 Coulter Counter (Beckman Coulter). Total chlorophyll extraction was done in 100% of methanol at 65°C and quantitative determination was done according to Lichtenthaler (1987).

3.4.3 Flow Cytometry Analysis

Algal samples having 2 μg of total chlorophyll were centrifuged to remove the media and fixed with 70% ethanol (Sigma-Aldrich) over night at 4°C . Flow cytometry analysis was performed on a Facscan flow cytometer (Becton Dickinson Instruments). Algal cells counts were estimated using the appropriate gate particle size (FSC-H) versus particle granularity (SSC-H). Analysis of DNA content was performed on 10,000 fixed cells stained with SYBR green I (3,000 x dilution of the

commercial solution, Molecular Probe). Cell cycle analysis was done with the Modfit software (Farinas 2006).

3.4.4 Determination of chlorophyll *a* fluorescence parameters

Prior to fluorescence measurements, treated algal samples were dark-adapted for 15 min to obtain oxido-reduction equilibrium of PSII-PSI electron transport carriers. Sample of algal cells (8 μg of chlorophyll *a*) were uniformly placed on 13 mm glass fiber filter (Millipore #AP20 013 00) by using low pressure filtration to avoid anaerobic physiological stress effect according to Dewez et al (2005). A Handy-Plant Efficiency Analyser fluorometer (Hansatech[®] Ltd., King's Lynn, Norfolk, UK) was used to measure the rapid and polyphasic chlorophyll *a* fluorescence kinetics during 1 s induced by a light intensity $2500 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Fluorescence yields (*F*) at investigated fluorescence transients were determined according to Strasser and Strasser (1995). Fluorescence yields were evaluated at 50 μs ($F_{50\mu\text{s}}$), 300 μs ($F_{300\mu\text{s}}$) and 2 ms ($F_{2\text{ms}}$). The maximal fluorescence yield, F_M was determined at P transient when plastoquinone pool was reduced at maximum level, while the fluorescence yield at 50 μs was considered to be F_O value as an indication for energy dissipation from antenna pigment before PSII primary photochemical act happens. The variable fluorescence indicating PSII primary photochemical act and the reduction state of plastoquinone pool was evaluated as $F_M - F_{50\mu\text{s}}$ (Strasser et al. 1995). In recent years, fluorescence parameters based on fluorescence yield at different transients were proposed to be a useful tool for the evaluation of pollutants' toxicity effect (see review Strasser et al. 2004). The increase of fluorescence yield at 300 μs was found to be caused by an inhibition of the water splitting system showing an increase of the ratio $M_O = (F_{300\mu\text{s}} - F_{50\mu\text{s}}) / ((F_M - F_{50\mu\text{s}}) \times 0.25)$ according to Strasser and Strasser (1995). The fluorescence yield at step J ($F_{2\text{ms}}$) is dependent on the reduction state of the PSII primary electron acceptor Q_A , therefore the ratio between the variable fluorescence yield at J transient and the maximum variable fluorescence yield was $V_J = (F_{2\text{ms}} -$

$F_{50\mu s})/(F_M - F_{50\mu s})$. This parameter has been used as an indicator for the efficiency of PSII primary photochemistry (Strasser and Strasser 1995). The quantum yield at P transient was evaluated as $\Phi_{P_0} = (F_M - F_{50\mu s})/F_M$ showing PSII efficiency in reduction of plastoquinone pool (Strasser et al. 2000). According to those indications, a new parameter was proposed indicating the transfer efficiency of absorbed-light energy from Chl *a* antenna (ABS) to PSII reaction center (RC). This parameter is evaluated as the ratio $ABS/RC = (M_O/V_I)/\Phi_{P_0}$ (Strasser et al. 2000).

3.4.5 Data analysis and statistic

The experiments were done in three replicates for all treatments. Means and standard deviation were estimated for each treatment. Significant differences between controls and dichromate treated samples were determined by using Student's t-test where P value less than 0.05 was considered to be significant.

3.5 Results and Discussion

By using different light regime, we were able to obtain synchronous division rate of algae population permitting to study each phase of the cell cycle. Synchronization of algal culture was obtained by repeating light/dark cycles of 16/8 hours. The starting point of the time scale for cell cycle analysis was chosen to be at the dark-to-light transition. We measured fluorescence transients and the percentage of cells for each phase every three hours during the entire synchronous cell cycle. To verify the synchronicity of algal population, we used the DNA content to be able to mark each phases of the cell cycle. First, we observe a pronounced increase of the G₂/M phase reaching 45% of the cell population at time 0 for the synchronized cultures. The abundance of cells in this phase slowly decreases during 9 hours of illumination and stay stable around 5-10% for the rest of the illumination period. It then increase back after a 5 hours of darkness. Secondly, the abundance of cells in G₁ phase slowly increases during the light period to around 85% of the cells population after 9 hours

and decrease rapidly during the dark time. Finally, the abundance of cells in S phase is around 5% and increase after 6 hours to stay stable for the rest of the day at around 20% (Figure 3). For cell growth in continuous light, cell cycle phases are stable throughout the day. We observe a level of 90% of cells in G₁, 5% in S and 5% in G₂/M phases. However, there is no significant increase or decrease of any phase during the 24h period (Figure 4). Cell cultures under continuous light during exponential phase don't go through mitosis at the same time, but spread out evenly during the day. When comparing with algae grown in light/dark regime, the ratio of cells in G₁ phase was about the same in both cultures after 9 hours of illumination. Light synchronization of algal cell cycle, by changing the cellular requirements for energy and by modifying the synthesis of different protein and pigment components of the chloroplast, can also affects photosynthetic processes within PSII. Indeed, light absorption, indicated by the relative antenna size per active PSII reaction center (ABS/RC) in the light/dark regime, changes significantly during the cell cycle (Figure 5). After the onset of light, the antenna size decreases and reaches a minimum approximately at the 9th hour, and then it increases to a maximum at around the 15th hours. Moreover, charge separation, representing the primary photochemical act where light energy is used to reduce the primary electron acceptor Q_A (TRo/RC), changes significantly during the illumination period in the synchronous growth also. We see a decrease during the first 9 hours followed by a quick recovery to its initial level around the 15th hours. This continuous increase during the dark period and reach it maximum after 5th hours of darkness. However, During the illumination period electron transport from Q_A to Q_B and plastoquinone pool (PQ, ETo/RC parameter) has shown an increase during the first 6th hours, returning to its original level for the next 6 hours and come back up to the same level achieved at the 6th hours for the rest of the days. This result may indicate that PQ pool size is not changed during cell division phase, resulting in an increase of electron transfers efficiency of the reduced electron flow coming from PSII reaction center. When comparing the electron transport with the different cell cycle phases,

we observed that the lowest value of ABS/RC, TRo/RC and ETo/RC coincides with the G₁ phases reaching its maximum level in the algae population. In comparison to the light/dark regime, the PSII principal photosynthetic parameters don't change much during the day in the continuous light culture. The slight change observed during the day in primary photosynthesis of continuous culture can be associated with the normal circadian cycle of the cell and not related to the cell cycle division (Hollnagel et al. 1996). In the light/dark regime the modification of photosynthesis can then be correlated to the phase of the cell cycle. Based on this conclusion, we can then try to understand the modification of the primary photochemistry in relation with cell cycle phases. The augmentation of the ABS/RC after the 15th hours might be linked to the reduction of active RC. The reduction of RC might be from a drop in the D1 protein content since its turnover is around 16 hours. The D1 protein synthesis is light regulated therefore it cannot be expressed during the dark period. Also, the change in the apparent antenna size of PSII might indicate a change in the number of LHC complexes per PSII reaction center. This might be due to an augmentation of RC or to lateness in the synthesis of antenna compared to the synthesis of RC after mitosis. To investigate that possibility, we then measured the chlorophyll and carotenoid content of each cell to verify that hypothesis.

The chlorophyll content per cell during the cell cycle phases was done every 3 hours during a 24 hours period. After the onset of light, the chlorophyll content in cell during the light period augmented rapidly during the first 6 hours and risen slightly afterward to its maximum concentration after 16th hours. The chlorophyll content, during the dark period, stays stable. The synthesis of chlorophyll under continuous light is stable and doesn't change significantly (data not shown). The pigment content of the algae was evaluated to confirm the hypothesis about the antenna complex formation (Figure 7). The carotenoid content are used in the formation of the antenna complex. The pattern of synthesis of the pigment follows an inverted curve similar to the ABS/RC and TRo/RC parameters (Figure 5). We can

see a sharp increase of synthesis during the first 3 hours. The S phase (maximum after the 6th hours, Figure 2) induce a drop in the carotenoid pigments since the chloroplast start to replicate and the cell stop producing structural protein to replicate it DNA (Farinas 2006). Light-dark cycles are a convenient tool to be able to obtain synchronized algal cell culture. Through its use we were able to identify and compare different cell cycle phases and its consequent effect on PSII activity. We were able to show that cell growths in continuous light don't go through synchronized dividing but random division. The use of a light cycle has shown that the majority of algal divided at one time during the cycle. The identification of each phases made possible to see their impact of the primary photosynthesis.

Follow the starting of the illumination, we found that the algae community were in majority in the G₂/M phases. Following the division the increase of G₁ phase resulted in increase of active reaction center shown by the change in ABS/RC and TRo/RC parameter. The active synthesis of RC was follow with high rate of chlorophyll and carotenoid pigment synthesis. During the S phase, a reduction in the carotenoid pigment synthesis was observed compared to the chlorophyll leading to an increase size of antenna complex per RC. The synthesis of the PSII center was link to the G₁ phase during which the light absorption and utilization was maximized. Synchronization of the cell cycle to the day/night rhythm affects the photosynthetic parameters related to PSII light absorption, charge separation and electron transport independently of the circadian cycle. It appeared that variations in photosynthetic parameters are not necessarily related to an adaptation response or a photoinhibitory effect of from irradiation, but rather to physiological changes associated with the cell cycle.

3.6 References

- Bisova K, Krylov DM, Umen JG (2005) Genome-wide annotation and expression profiling of cell cycle regulatory genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 137:475-91
- Dewez D, Geoffrey L, Vernet G, Popovic R (2005) Determination of photosynthetic and enzymatic biomarkers sensitivity used to evaluate toxic effects of copper ions and fludioxonil in alga *Scenedesmus obliquus*. *Aquat Toxicol* 74:150–159
- Dewitte W, Murray JA (2003) The plant cell cycle. *Annu Rev Plant Biol* 54:235-264
- Farinas B, Mary C, de O Manes C, Bhaud Y, Peaucellier G and Moreau H. (2006) Natural synchronisation for the study of cell division in the green unicellular alga *Ostreococcus tauri*. *Plant Molecular Biol* 60:277–292
- Hagiwara SY, Bolige A, Zhang Y, Takahashi M, Yamagishi A, Goto K (2002) Circadian gating of photoinduction of commitment to cell-cycle transitions in relation to photoperiodic control of cell reproduction in *Euglena*. *Photochem Photobiol* 76:105-15
- Harris EH (1989) The *Chlamydomonas* sourcebook: a comprehensive guide to biology and laboratory use. Academic Press, San Diego, CA
- Harris EH (1998) Chapter 1: Introduction to *Chlamydomonas*. In: Rochaix J-D, Goldschmidt-Clermont M, Merchant S (eds) The molecular biology of chloroplasts and mitochondria in *Chlamydomonas*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 1-11
- Heil WG, Senger H (1986) Thylakoid-protein phosphorylation during the life cycle of *Scenedesmus obliquus* in synchronous culture. *Planta* 167:233–239

Hollnagel HC, Di Mascio P, Asano CS, Okamoto OK, Stringher CG, Oliveira MC, Colepicolo P (1996) The effect of light on the biosynthesis of beta-carotene and superoxide dismutase activity in the photosynthetic alga *Gonyaulax polyedra*. *Braz J Med Biol Res* 29:105-10

Jacquet S, Partensky F, Marie D, Casotti R, Vaultot D. (2001) Cell cycle regulation by light in *Prochlorococcus* strains. *Appl Environ Microbiol.* 67:782-90.

Kaftan D, Meszaros T, Whitmarsh J, and Nedbal L (1999) Characterization of Photosystem II Activity and Heterogeneity during the Cell Cycle of the Green Alga *Scenedesmus quadricauda*. *Plant Physiol* 120:433-441

Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: Packer L, Douce R (eds) *Methods in enzymology*, vol 148. Academic Press, London, pp 350-382

McAteer, M., Donnan, L. and John, P. (1985) The timing of division in *Chlamydomonas*. *New Phytol.* 99: 41-56.

Spudich J and Sager R (1980) Regulation of the *Chlamydomonas* cell cycle by light and dark. *J Cell Biol* 85:136-145

Strasser BJ, Strasser RJ (1995) Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: the JIP-test. In: Mathis P (ed) *Photosynthesis: from light to biosphere*, vol. V. Kluwer Academic Publishers, pp 977-980

Strasser BJ (1999) Donor side capacity of Photosystem II probed by chlorophyll a fluorescence transients. *Photosynth Res* 52:147-155

Strasser RJ, Srivastava A, Govindjee (1995) Polyphasic Chlorophyll *a* fluorescence transient in plants and cyanobacteria. *Photochem Photobiol* 61:32-42

Strasser RJ, Srivastava A, Tsimilli-Michael M (2000) The fluorescence transient as a tool to characterise and screen photosynthetic samples. In: Yunus M, Pathre U, Mohanty P (eds) *Probing Photosynthesis: Mechanism, Regulation and Adaptation*, Taylor & Francis, Bristol, pp. 445–483

Strasser RJ, Srivastava A, Tsimilli-Michael M (2004) Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient. In: Papageorgiou G, Govindjee (eds) *Advances in photosynthesis and respiration*, vol. 19, Chlorophyll fluorescence a signature of photosynthesis. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp 321–362

Suzuki K, Ehara T, Osafune T, Kuroiwa H, Kawano S, Kuroiwa T (1994) Behavior of mitochondria, chloroplasts and their nuclei during the mitotic cycle in the ultramicroalga *Cyanidioschyzon merolae*. *Eur J Cell Biol* 63:280-288.

Yee MC and Bartholomew JC (1988) Light regulation of the cell cycle in *Euglena gracilis bacillaris*. *Cytometry* 9:387–393.

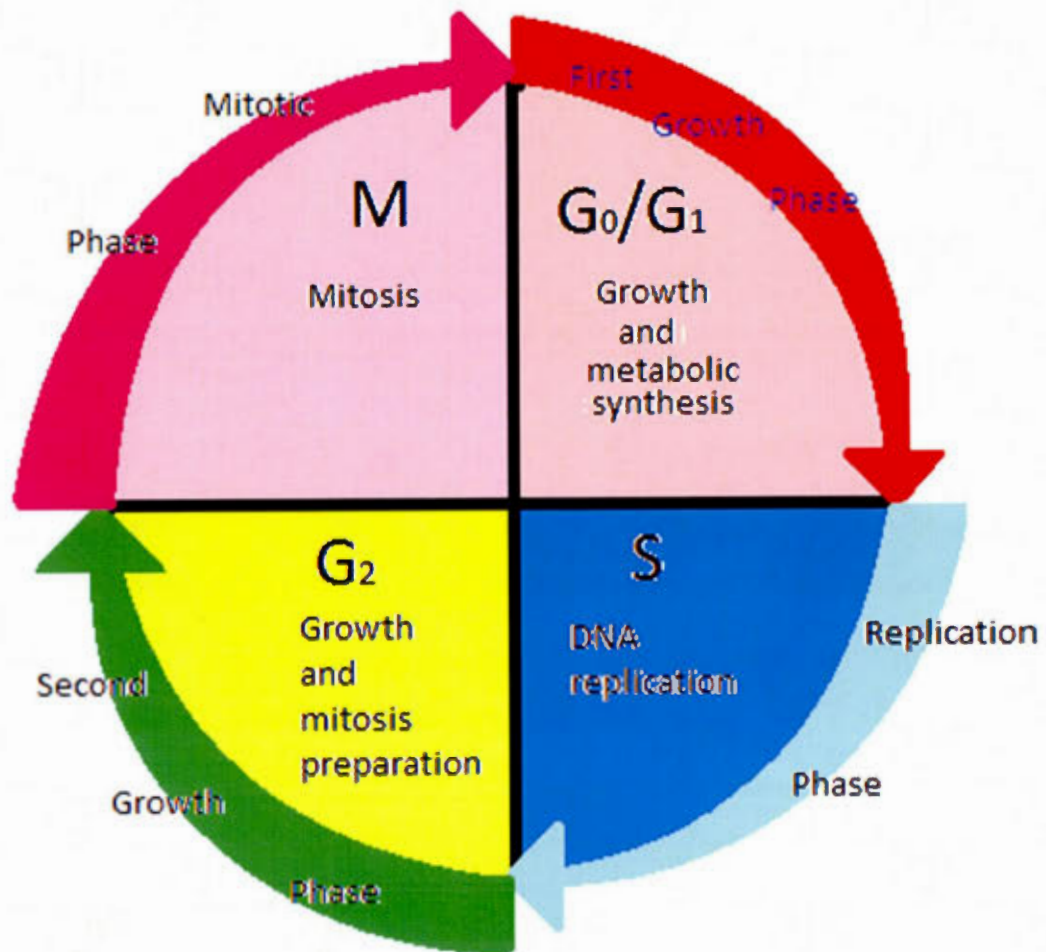


Figure 3.1 : The cell cycle is composed of four phases: G₁, S, G₂ and M.

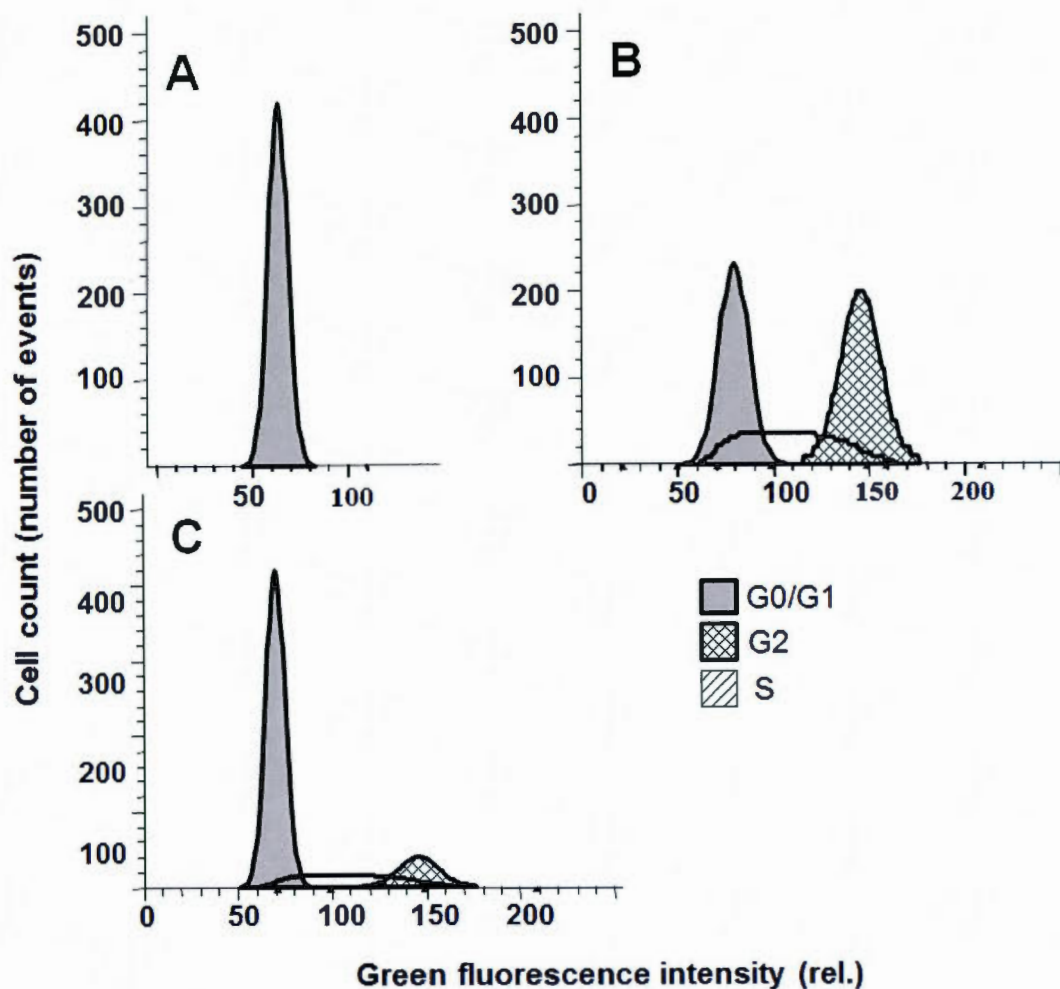


Figure 3.2: Ratio of the cell population (10,000 cells) under the different cell cycle phases (G₀/G₁, S and G₂/M) for algal cells grown under a light regime of 16h light and 8h of darkness (a) and under continuous illumination (b). The shaded background of the top figure represents the darkness period.

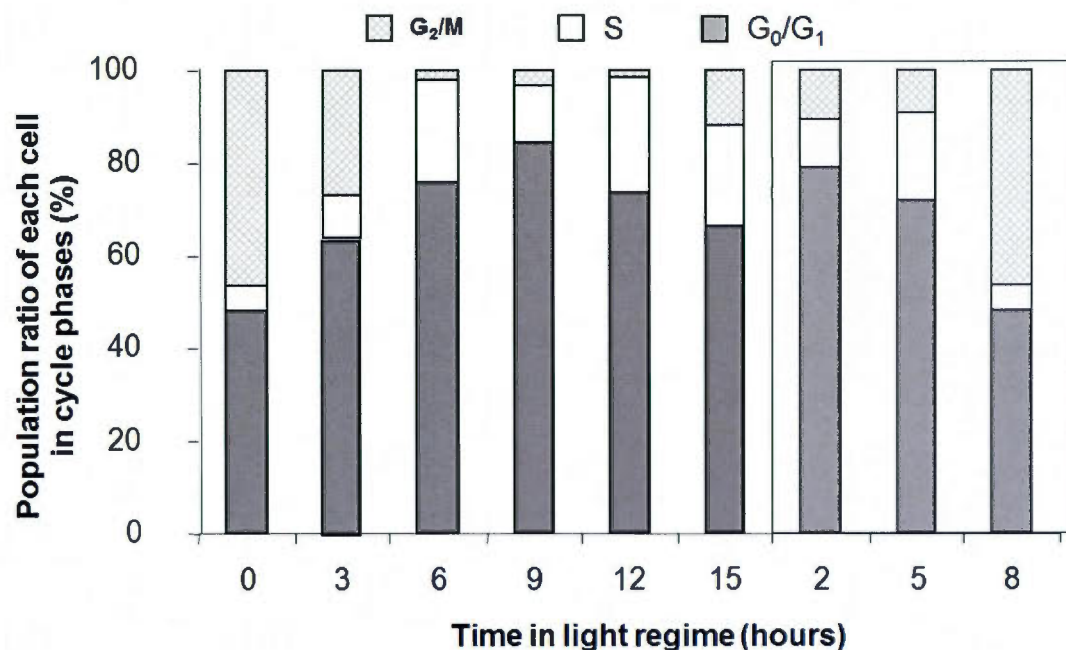


Figure 3.3: Ratio of the cell population under a light regime of 16 hours light and 8 hours of darkness (in gray). Cells were culture for three weeks under a light/dark regime of 16h/8h ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and divided every three days to maintain exponent ion growth. The G₁ phase (gray) around 45% when the light turn then increase around 85% after an illumination period of 9 hours to slowing decrease back to the small level at the end of the dark period. The S phase (white) increase rapidly after an illumination period of 6 hours and stay steady for the next 15 hours leaving time for the cell to complete it DNA replication. The G₂/M phase (cross line) is at it highest level when the light turn on, then decrease rapidly over the next 6 hours to be back at the same level after an exposition of 8 hours in darkness (error bars were remove to simplify graphic since they varie around 2-3% of each point).

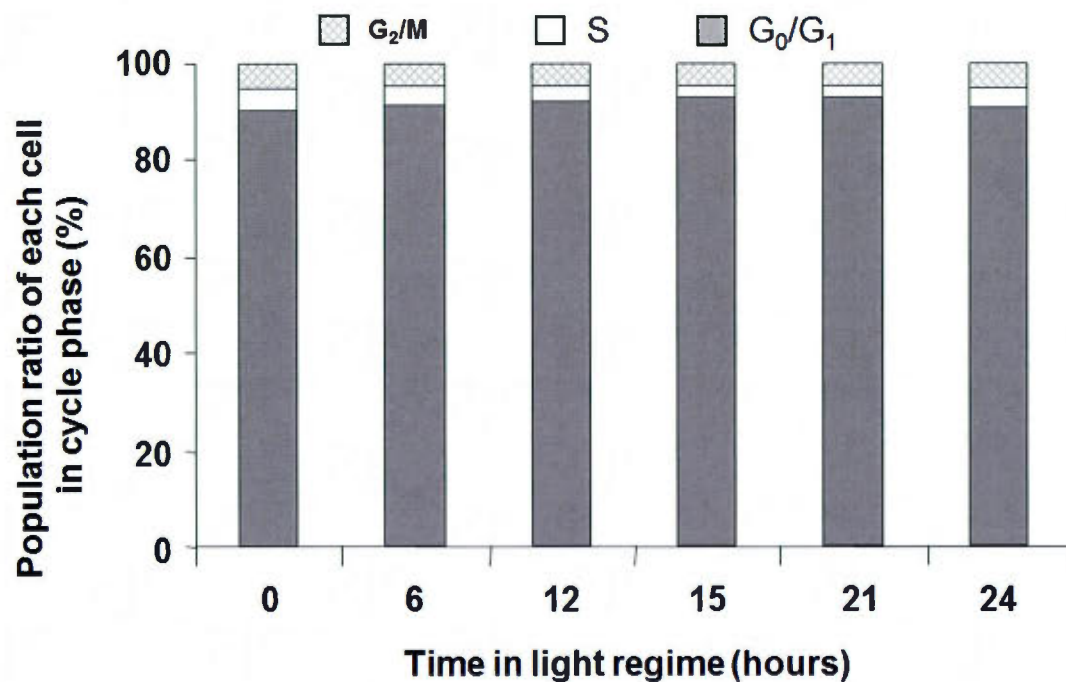


Figure 3.4: Ration of the cell population under continuous light regime. The algae were culture for three weeks under continuous light regime ($100\mu \text{ Em}^{-2}\text{s}^{-1}$), divided every three days to maintain the exponential growth. The G_1 phase under continuous light (gray) stay around 90% all day long. The S phase (white) stay steady around 5% as the G_2/M phase (cross line). (error bars were remove to simplify graphic since they varie around 2-3% of each point)

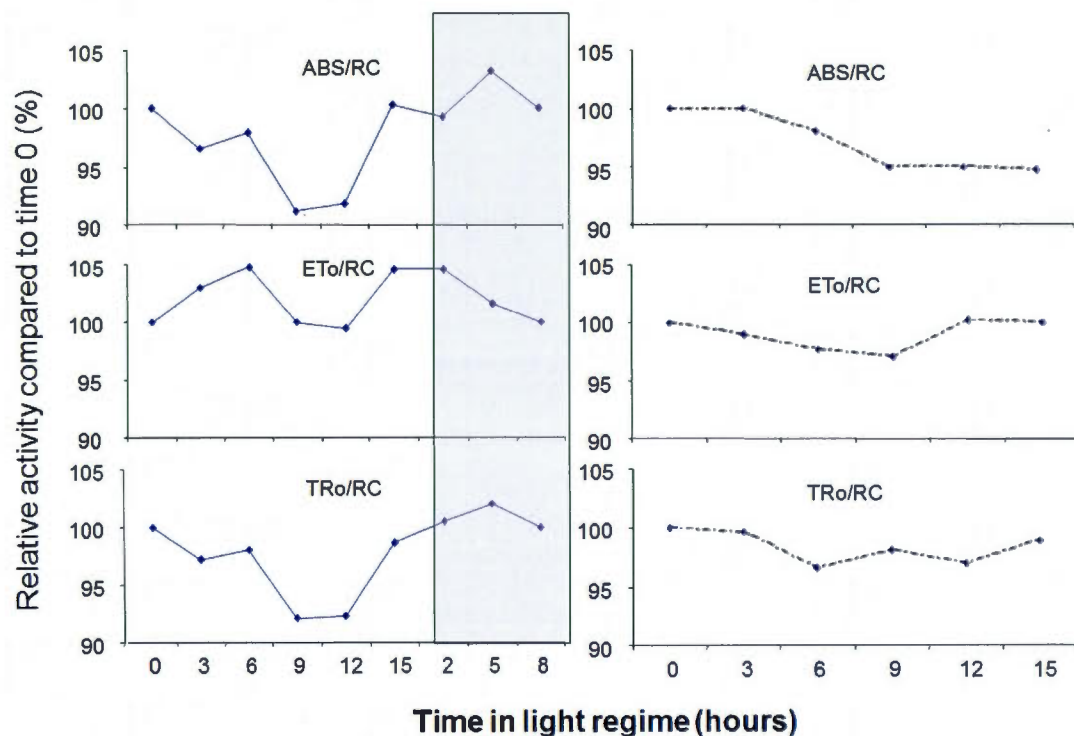


Figure 3.5: The algae were culture for three weeks under continuous light or light/dark regime ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), divided every three days to maintain the exponential growth The principal photosynthetic parameters measure with the PEA every 3 hours during light cycle or continuous light (error bars were remove to simplify graphic since they varie around 2-3% of each point).

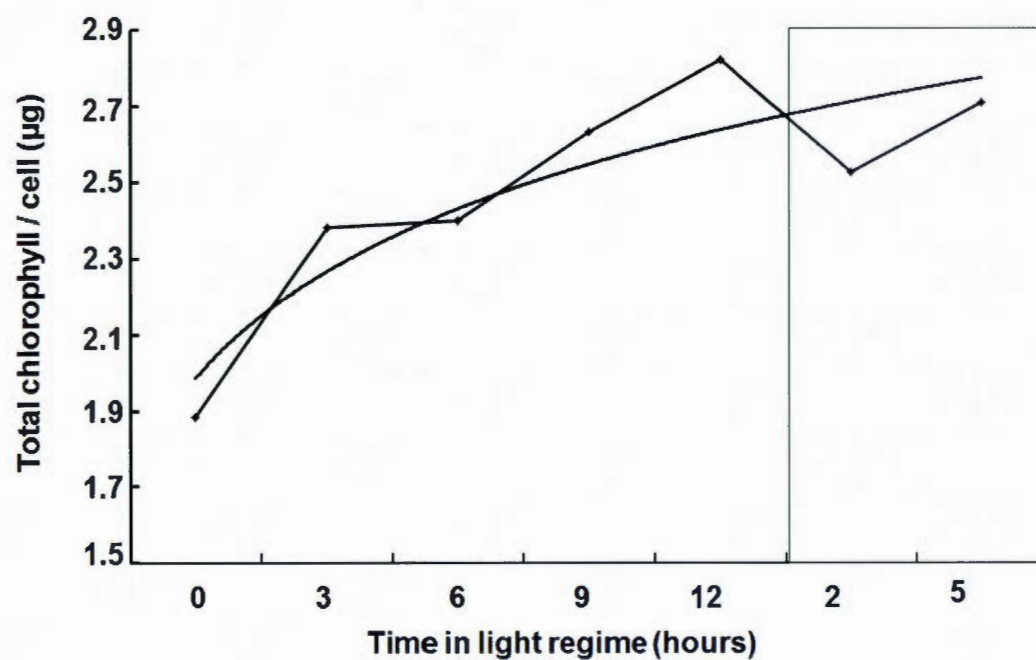


Figure 3.6: Chlorophyll synthesis during the light/dark regime. The algae were culture for three weeks under light/dark regime ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), divided every three days to maintain the exponential growth. One millilitres of the cell culture was taken to by counter by Multisizer 3 Coulter Counter and the chlorophyll content was analyzed using the protocol explained earlier.

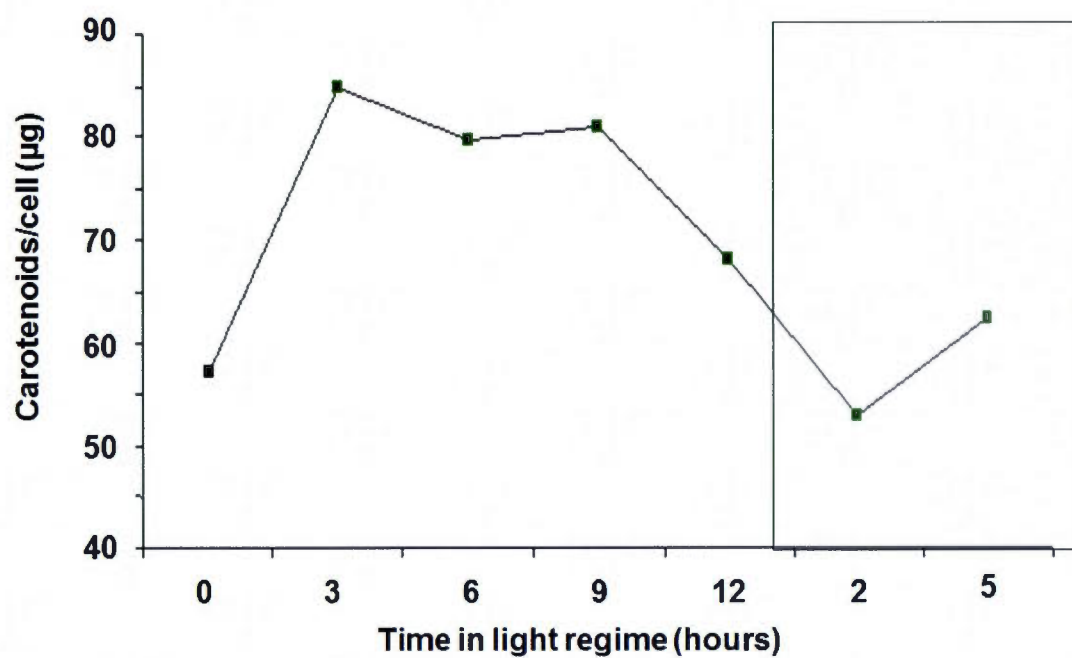


Figure 3.7: Carotenoids synthesis during the light/dark regime. The algae were culture for three weeks under light or light/dark regime ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), divided every three days to maintain the exponential growth. One millilitres of the cell culture was taken to by counter by Multisizer 3 Coulter Counter and the pigment content was analysing using the protocol explained earlier.

CHAPITRE IV

**THE EFFECT OF CHROMIUM ON PHOTOSYSTEM II
ACTIVITY IN *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* CELLS IN
SYNCHRONOUS AND ASYNCHRONOUS CULTURES**

Olivier Didur, François Perreault, Abdallah Oukarroum, David Dewez, Radovan Popovic *

Department of Chemistry, University of Quebec in Montreal. C.P. 8888, Succ.
Centre-Ville, Montreal. Quebec, H3C 3P8 Canada.

* Correspondence to: Radovan Popovic; email: popovic.radovan@uqam.ca. Phone
number: 514-987-3000 #8467. Fax: 514-987-4054

4.1 Résumé

Les effets inhibiteurs du chrome sur l'activité du photosystème II (PSII) ont été étudiés chez l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* durant les différentes phases du cycle cellulaire (G_0/G_1 , S et G_2/M). La croissance des algues a été maintenue sous une illumination constante ou un cycle lumière/obscurité (16/8h) afin d'obtenir une homogénéisation de la culture. Les phases du cycle cellulaire ont été déterminées par le contenu en ADN des cellules par la cytométrie de flux. Les effets du Cr sur le PSII a été observé suite à un traitement de 24h chez des cultures d'algues en majorité en G_0/G_1 , en S ou G_2/M . L'analyse des paramètres de fluorescence lente comme indicateur du rendement quantique maximale (ϕ_{mII}) et opérationnel (ϕ'_{mII}) de la photosynthèse nous avons permis de constater une variation de la sensibilité des effets toxiques du chrome durant le cycle cellulaire. Pendant la phase de la mitose, l'effet de toxicité du chrome sur la photosynthèse semble être beaucoup plus élevé. Pendant ce cycle, le rendement quantique du PSII a diminué de 80% par rapport à des algues dans les phases G_0 .

4.2 Abstract

The inhibitory effect of chromium (Cr) on photosystem II (PSII) activity was investigated in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* during different phases of the cell cycle. Algae were cultivated in continuous light or a light/dark cycle (16/8 h) to obtain a synchronously dividing cell culture. The cell division phases were determined with the DNA-specific fluorescent probe SYBR-green using flow cytometry. The effect of Cr on PSII activity was investigated after 24 h treatment with algal cultures having different proportions of newly divided cells (G_0/G_1), dividing cells at the DNA replication phase (S) and dividing cells at the mitosis phase (G_2/M). Using chlorophyll *a* fluorescence parameters based on PSII electron transport capacity in dark (Φ_{MII}) and light-adapted (Φ'_{MII}) equilibrium state, we found that the effect of Cr differs depending on the stage of the cell cycle. When algal cultures had a high proportion of cells actively dividing (M phase), the toxic effect of Cr on PSII activity appeared to be much higher and PSII quantum yield was decreased by 80% compared to algal cultures mainly in the G_0/G_1 phase. Therefore, the inhibitory effect of Cr on photosynthesis appears to be different according to the cell cycle state of the algal population.

Key Words.

cell cycle, photosynthesis, chromium toxicity, *Chlamydomonas reinhardtii*.

4.3 Introduction

Cr can be released in the environment due to its applications in paper pulp production, leather tanning, electroplating and petroleum refining (Saha et al. 2011). Cr exists under several oxidation states however, in the environment, Cr(III) and Cr(VI) are the most common species (Zayed and Terry 2003). Cr(VI), found as chromate (CrO_4^{2-}), dichromate ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) and hydrochromate (HCrO_4^-), is the most water-soluble form of Cr and therefore the most common in aquatic ecosystems (Saha et al. 2011). Cr(VI) is also known to be the most toxic form of Cr and water quality guidelines suggest a Cr(VI) concentration of $1 \mu\text{g l}^{-1}$ in aquatic ecosystems (Canadian Council of Ministers of the Environment 1999). However, in freshwater, Cr concentrations can range from trace amounts to up to $117 \mu\text{g l}^{-1}$ in contaminated waters (Zayed and Terry 2003). The assessment of Cr toxicological risk is therefore of importance and understanding the factors influencing the cellular response to Cr may provide useful information on the impacts of Cr in aquatic ecosystems.

Microalgae, as the primary producers in aquatic ecosystems, are a major part of the aquatic trophic chain. Microalgae are known to be sensitive to the presence of contaminants and are therefore frequently used as model organisms for toxicity assays. In particular, the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* is a choice model for photosynthetic microorganisms due to its easy laboratory manipulation, its minimal nutritional requirements and the advanced understanding of its biology (Hanikenne 2003). *C. reinhardtii* was found to be sensitive to the effects of Cr, which induced in this alga an alteration of the photoreceptive systems (Rodriguez et al. 2007), a decrease of photosynthetic activity (Ait Ali et al. 2008; Perreault et al. 2009) and the induction of oxidative stress (Szivak et al. 2009). For photosynthetic processes, important Cr effects were found at the level of Photosystem II (PSII), where light energy is absorbed by chlorophyll (Chl) pigments of the light-

harvesting antenna and transferred to the PSII reaction center to trigger the photolysis of water that fuel the photosynthetic electron transport chain from PSII to nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), via the cytochrome b_6f and Photosystem I complexes. This electron transport chain also serves to generate a trans-thylakoidal proton gradient for the synthesis of adenosine tri-phosphate (ATP). NADPH and ATP will be used for the formation of carbohydrates in the biochemical reactions of the Calvin cycle (Baker 2008). The effects of Cr will alter these processes by reducing the electron transport rate from PSII reaction center towards the primary electron acceptor Q_A (Appenroth et al. 2001). The alteration of the oxygen evolving rate was also taken as evidence that water splitting system can be affected when *Spirodela polyrhiza* was exposed to Cr (Appenroth et al. 2001). The effect of Cr on PSII structural properties was found to be associated with the decrease of PSII D1 protein and oxygen-evolving complex 33 kDa protein (Ait Ali et al. 2006; Perreault et al. 2009). Consequently, PSII activity is very sensitive to Cr and photosynthetic bioindicators are considered reliable indicators of toxicity for this contaminant (Mallick and Mohn 2003).

Algal cell division is composed of four transition states named gap phase 0 (G_0), gap phase 1 (G_1), synthesis phase (S), gap phase 2 (G_2) and mitosis (M). The G_0 is the resting phase before the initiation of the cell division cycle. The initiation of the G_1 phase is characterized by intensive metabolite processing such as proteins and carbohydrates synthesis (Hagiwara et al. 2002). During the S phase, DNA synthesis is initiated by the condensation of nuclear DNA into the chromosome structure. The end of DNA duplication leads to the G_2 phase during which the control of the replication of all DNA happens. Finally, at the M phase, cell division takes place leading to the formation of two daughter cells with complete functional cellular systems. In algal cells, light is also influential in the progression of cells through the different division phases (Spudich and Sager 1980). Priory exposure to light appears to be a major regulatory step in the initiation of the G_1 phase in algae (Hagiwara et al. 2002). By

using a light/dark regime, it is therefore possible to modify the cell community distribution within the G₀, G₁, S, G₂ and M phases. During the cell cycle, photosynthetic processes will be altered to reflect the cellular need for ATP and NADPH (Kaftan et al. 1999; Strasser et al. 1999; Farinas et al. 2006), which in turn was shown to modulate the toxicity of atrazine, a specific PSII Q_B-binding herbicide (Didur et al. 2012). However, the relationship between the alteration of PSII functions during the cell cycle and the effects of contaminants with different inhibitory sites is still a matter of investigation.

This study aimed to determine the dependency between cell cycle phases, PSII activity and the effect of Cr using *C. reinhardtii* cultures grown under different light regime. The toxicity of Cr was evaluated using photosynthetic indicators to determine the sensitivity of PSII processes to the effect of Cr under different synchronization state of the cell cycle. The elucidation of the role of light regimes, regulating the cell division cycle, may provide a better understanding of the sensitivity of microalgae towards the effect of Cr under natural conditions.

4.4 Materials and methods.

4.4.1 Algal culture

C. reinhardtii (wild type: CC-125) was obtained from the *Chlamydomonas* Resource Center (Duke University, NC) and cultivated in 100 ml batch cultures in high salt growth medium (HSM) (Harris 1989). The pH of HSM media was measured as 7.1, with an ionic strength of 0.0487. Culture glassware and medium were autoclaved to obtain sterile culture conditions. Asynchronous cultures were grown under continuous illumination ($100 \pm 25 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and synchronous cultures under a 16 h light / 8 h dark cycle, provided by white fluorescent lamps (Sylvania GroLux F 36 W) at $27 \pm 1^\circ\text{C}$. The culture was placed on an orbital shaker (120 rpm) and permanently aerated to obtain constant CO_2 concentration in the growing medium. Algal cell density was measured with a Multisizer 3 Coulter Counter (Beckman Coulter, USA). Total Chl extraction was done in 100% methanol at 65°C and quantitative determination was done according to Lichtenthaler (1987).

When algal cultures were in the exponential growth phase (36 h after culture dilution with fresh media), Cr treatments were performed. In clean, acid-washed and sterile erlenmeyers, a volume of culture equivalent to 100×10^6 cells was placed, Cr ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) was added from a 20 mM stock solution prepared in sterile HSM medium and culture cell density was adjusted using fresh sterile HSM medium. The initial cell density of the treatments was of 1×10^6 cells ml^{-1} and total nominal Cr concentrations were 0 (Ctrl), 12.5, 25 and 50 μM . High cell density and Cr concentrations were used to obtain a clear and fast response under laboratory conditions. Cr speciation in the HSM media was calculated using the Visual MINTEQ equilibrium software and it was found that different Cr species in the medium were similar for the different Cr concentrations used (Table 1). Treatments were realized under the same conditions as for algal culture.

4.4.2 Flow Cytometry Analysis

Algal samples having 2 μg of total Chl were centrifuged (6,000 g, 10 min) to remove the media and fixed with 70% ethanol overnight at 4°C. Flow cytometry analysis was performed on a Facscan flow cytometer (Becton Dickinson Instruments). The distinction between algal cells and non-algal particles was done by using the appropriate gate of particle size (FSC-H) versus particle granularity (SSC-H). Analysis of DNA content was performed on 10,000 fixed cells stained with SYBR green I (3,000 x dilution of the commercial solution, Molecular Probe). Cell cycle analysis was done with the Modfit software (Farinas et al. 2006).

4.4.3 Determination of chlorophyll *a* fluorescence parameters

To ensure that Chl *a* fluorescence kinetics of algal cultures were measured in the selected cell cycle distribution, Chl *a* fluorescence were measured simultaneously in one batch for all samples by using the MAXI-Imaging PAM fluorometer (Walz, Germany). Prior to fluorescence measurements, algal samples were dark-adapted for 15 min. Sample of algal cells (8 μg of Chl) were slowly filtered by hand on 13 mm glass fiber filter to form a uniform humidified layer of algae. The fluorescence F_0 , the basal fluorescence yield from chlorophyll pigments of light-harvesting complexes, was evaluated by using a modulated blue (450 nm) light with a low intensity (1 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) to avoid the reduction of PSII primary electron acceptor, Q_A . The maximum fluorescence yield, F_M , was induced by a short, saturating light pulse (5000 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 0.8 s), causing maximal reduction of PSII. The value of F_S , the steady-state fluorescence intensity obtained by an actinic illumination, was determined in algae exposed 10 min to continuous actinic light (100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). The maximum fluorescence yield induced by a saturating flash in algae at the steady-state of electron transport, F'_M , was determined by the application of a saturating light (5000 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 0.8 s) in algae exposed 10 min to continuous actinic light. The maximum PSII

quantum yield, indicating efficiency of light energy transfer to primary acceptor Q_A , was determined as the ratio $\Phi_{MII} = (F_M - F_0)/F_M$ (Kitajima and Butler 1975). According to Genty et al (1989), the operational quantum yield was determined as the ratio $\Phi'_{MII} = (F'_M - F_S)/F'_M$.

4.4.4 Data analysis and statistic

Three replicate measurements by experiment were done for control algal samples (no Cr) and for each exposure concentration of Cr, and the experiment was repeated three times. Significant differences between control and Cr-treated samples were determined by using Student's t-test where p value less than 0.05 was considered to be significant.

4.5 Results and Discussion

Effect of light cycle on the phases of mitosis

Synchronization of the algal cell cultures was obtained by repeated application of dark-light cycles (16 h light, 8 h darkness); the transition from dark to light was designated as time 0, which coincides with mitosis in *C. reinhardtii* when cell cultures are synchronous (Strasser et al. 1999). The percentage of cells in each phase of the cell cycle was measured every 3 h during the entire illumination cycle using the DNA content as a marker for the cell phase (Farinas et al. 2006). In cultures grown under a light/dark cycle, the proportion of cells in the G₂/M phase was of 45% of the cell population at time 0 (Figure 1a, cross hatched bars). The proportion of cells in the G₂/M phase slowly decreased to 5-10% during the following 9 h of illumination and stayed stable at this proportion for the rest of the illumination period. Then, in the dark, the proportion of cells in the G₂/M phase returned to 45% after 8 h of darkness (Figure 1a). Cells in the G₀/G₁ phase slowly increased from 45% to around 85% of the cell population during the first 9 h of illumination and decreased rapidly to 45% during the dark period (Figure 1a, grey bars). The S phase starts around 5% of the cell population and increases to 20% of the cell population after 6 h of illumination. The S phase then decreases back to 5% of the cell population after an 8 h darkness period (Figure 1a, white bars). The synchronous cell cycle in *C. reinhardtii* in our study differs from synchronous cultures of other microalgae by the delay in the peak of dividing (G₂/M) cells, which was observed 8 h after the entry into the dark period. In the photosynthetic prokaryote *Prochlorococcus* PCC 9511 and the green alga *Ostreococcus tauri*, the peak of the G₂/M phase was observed in the light phase, about 4 hours before the beginning of the darkness period (Jacquet et al. 2001; Farinas et al. 2006). These differences might be due to the differences in the light conditions and photosynthesis rate of these different algal species, as it was found, in the rhodophyte *Cyanidioschyzon merolae*, that the passage from the G₁ to S phase

required a critical level of nutrient such as those derived from the photosynthetic activity (Moriyama et al. 2010). For cells grown in continuous light, or asynchronous conditions, the proportion of cells in each of the phases is stable throughout the day with 90% of cells in G_0/G_1 phase, 5% of cells in S phase and 5% of cells in G_2/M phase. It appears that algae do not go through mitosis at the same time when grown under continuous illumination, and that mitosis is spread out evenly during the day (Figure 1b). Stabilisation of the cell cycle under continuous light was also found for *Prochlorococcus* strains after 72 h of culture under continuous illumination (Jacquet et al. 2001). When compared with algae grown in light/dark regime, the ratio of cell in G_0/G_1 phase was about the same in both cultures after 9 h of illumination.

Effect of chromium on PSII in synchronous and asynchronous cultures

The relationship between the cell cycle and the sensitivity of the photosynthetic apparatus to Cr was investigated using both synchronous and asynchronous algal cell cultures. The effect of Cr on PSII activity was determined at different Cr concentrations after a 24 h treatment of cultures grown under continuous illumination (90% of cells in G_0/G_1 phase), culture grown under light/dark cycle at $t=0$ (around 45% of cells in both the G_0/G_1 and G_2/M phases) and after 9 h of illumination (85% of cells in the G_0/G_1 phase). Toxicity was assessed as the capacity of PSII for primary electron transport reactions (PSII maximum quantum yield Φ_{MII}) and whole chain electron transport rate at the equilibrium state of photosynthesis (PSII operational quantum yield Φ'_{MII}). Algal cells were found to be more affected by Cr in cultures where the proportion of cells in the G_2/M phase was high, compared to cultures where the proportion of cells in the G_0/G_1 phase were high. That is, cells from the continuous light regime were less sensitive than cells from with the light/dark regime. In addition, cells at $t = 0$ in the synchronous cultures with a 16h:8h light cycle (with the highest proportion of cells in the G_2/M phase) were more sensitive than cells at $t=9$ in (highest proportion of cells in the G_0/G_1 phase) (Figure

2). Specifically, the culture grown under continuous light showed a 20% reduction of Φ_{MII} at 50 μM Cr. At this concentration, similar results were found for light/dark grown cultures with Cr added at $t=9$ (Figure 2a). On the other hand, a 50% decrease of Φ_{MII} was seen at 25 μM Cr in light/dark grown cultures when Cr was added at $t=0$, while it was completely inhibited at 50 μM .

Since Cr has inhibitory effects at several sites on the photosynthetic apparatus (Ait Ali et al. 2006; Horcsik et al. 2007; Perreault et al. 2009), photosynthetic indicators that are related to the whole electron transport chain, from water-splitting activity to the formation of NADPH, may be more sensitive to the effect of Cr. When the whole chain electron transport is considered, the inhibitory effects of Cr are more pronounced, as indicated by the higher sensitivity of the PSII operational quantum yield (Φ'_{MII}) to Cr compared to the maximum quantum yield (Φ_{MII}). The decrease of Φ'_{MII} reached 50% of control value for algae grown under continuous light exposed to 50 μM Cr, while for the same Cr concentration Φ'_{MII} was decreased to 35% and 0% of control value in cultures grown under light/dark cycle, respectively taken after 9 h of illumination (85% G_0/G_1 phase) and at $t=0$ (around 45% both G_0/G_1 and G_2/M phases) (Figure 2b).

Using both operational and maximal quantum yields as a measure of PS II function, algal cells were more sensitive to Cr when there were a high percentage of cells in the G_2/M phase. This is in contrast to previous findings that indicated that algal cells were more sensitive to atrazine when cells were in the G_0/G_1 phases, which was hypothesized to be due to the requirement of active photosynthesis for cell growth in the early steps of cell division (Didur et al. 2012). The different sensitivity of algae towards atrazine and Cr during the cell cycle phases may be due to the action mechanism of atrazine, a specific Q_B -binding herbicide (Diner and Petrouleas 1987), compared to Cr, which has inhibitory effects on the oxygen evolving complex, PSII D1 protein and PSI (Ait Ali et al. 2006; Horcsik et al. 2007; Perreault et al. 2009). In

addition, Cr is known to have deleterious effects on DNA integrity in microalgae (Labra et al. 2007; Swaminathan et al. 2009). This effect of Cr on DNA may be involved in the higher sensitivity of algal cells in the G₂/M phase, where DNA replication takes place.

When the different light regimes are compared, our results show that PSII activity in algae grown under a light/dark cycle is more affected by the presence of Cr than for algae grown under continuous illumination. Previously, using the green alga *Chlorella pyrenoidosa*, the effect of Cr was found to be light-dependent and closely associated with oxidative stress and PSII photoinhibition (Horcsik et al., 2007). Several steps of PSII photoinhibition and repair cycle are known to be light regulated (Mohanty et al., 2007) therefore the light/dark cycle used for algal cultures may have reduced the capacity of the cell to regulate the effect of Cr on PSII activity compared to algae grown under continuous light. However, when the cell cycle phases are considered for light/dark grown cultures, our results indicate that during the mitosis phase, the effect of Cr on photosynthesis is increased. During the cell division, Cr may alter DNA replication and migration preceding the cell division (Eleftheriou et al. 2011). These effects of Cr may therefore increase its toxicity compared to cells in the G₀/G₁ phase, where the cellular machinery is focused on protein synthesis and cell growth (Hagiwara et al. 2002). In the environment, the passage of alga into the cell division cycle also has a synchronicity that is, in part, light-regulated. For example, cell division in the marine green alga *Ulva pseudocurvata* and red alga *Porphyra umbilicalis* was found to increase when photosynthesis declined and mitosis peaked 1 h before dark under natural conditions (Kalita et al. 2007). These periods of the diurnal cycle, when most of the algal cells enter the mitosis M phase, may represent a more sensitive moment for the entry of Cr into the ecosystems. Such variation of sensitivity occurring under natural conditions is not represented in traditional algal bioassays, which are often realized using continuously grown algae.

This study shows that light regime, by modifying the cell cycle regulation of microalgae, may influence the toxic response of Cr. In toxicity assays, this effect should be taken into account when dealing with algal cells grown under a light/dark regime. On the other hand, cells grown under continuous light may provide better reproducibility at the cost of a lower sensitivity.

4.6 Acknowledgements

This research was supported by a Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) grant awarded to RP.

4.7 References.

- Ait Ali N, Dewez D, Didur O, Popovic R (2006) **Inhibition of photosystem II photochemistry by Cr is caused by the alteration of both D1 protein and oxygen evolving complex.** Photosynth Res 89:81-87
- Ait Ali N, Juneau P, Didur O, Perreault F, Popovic R (2008) **Effect of dichromate on photosystem II activity in xanthophyll-deficient mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*.** Photosynth Res 95:45-53
- Appenroth KJ, Stöckel J, Srivastava A, Strasser RJ (2001) **Multiple effects of chromate on the photosynthetic apparatus of *Spirodela polyrhiza* as probed by OJIP chlorophyll a fluorescence measurements.** Environ Pollut 115:49-64
- Baker NR (2008) Chlorophyll Fluorescence: **A Probe of Photosynthesis In Vivo.** Annu Rev Plant Biol 59:89–113
- Canadian Council of Ministers of the Environment (1999) Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life. No. 1299; ISBN 1-896997-34-1
- Didur O, Perreault F, Oukarroum A, Dewez D, Popovic R (2012) **Alteration of photosystem II activity by atrazine on *Chlamydomonas reinhardtii* synchronized and asynchronized cell cycle cultures.** Toxicol Environ Chem 94:906-917.
- Eleftheriou EP, Adamakis ID, Melissa P (2011) **Effects of hexavalent chromium on microtubule organization, ER distribution and callose deposition in root tip cells of *Allium cepa* L.** Protoplasma 249:401-416
- Farinas B, Mary C, de O Manes C, Bhaud Y, Peaucellier G, Moreau H (2006) **Natural synchronisation for the study of cell division in the green unicellular**

alga *Ostreococcus tauri*. *Plant Molecular Biol* 60:277–292

Genty B, Briantais JM, Baker NR (1989) **The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence.** *Biochim Biophys Acta* 990:87-92

Hagiwara SY, Bolige A, Zhang Y, Takahashi M, Yamagishi A, Goto K (2002) **Circadian gating of photoinduction of commitment to cell-cycle transitions in relation to photoperiodic control of cell reproduction in *Euglena*.** *Photochem Photobiol* 76: 105-15

Hanikenne M (2003) ***Chlamydomonas reinhardtii* as a eukaryotic photosynthetic model for studies of heavy metal homeostasis and tolerance.** *New Phytologist* 159:331–340

Harris EH (1989) **The *Chlamydomonas* Sourcebook: A comprehensive guide to biology and laboratory use.** San Diego, CA, Academic Press, 780 p.

Horcsik ZT, Kovacs L, Laposi R, Meszaros I, Lakatos G, Garab G (2007) **Effect of chromium on photosystem II in the unicellular green alga, *Chlorella pyrenoidosa*.** *Photosynthetica* 45:65–69

Jacquet S, Partensky F, Marie D, Casotti R, Vaultot D (2001) **Cell Cycle Regulation by Light in *Prochlorococcus* Strains.** *Appl Environ Microbiol* 67:782–790

Kaftan D, Meszaros T, Whitmarsh J, and Nedbal L (1999) **Characterization of Photosystem II Activity and Heterogeneity during the Cell Cycle of the Green Alga *Scenedesmus quadricauda*1.** *Plant Physiol* 120:433–441

Kalita TL, Titlyanova TV, Titlyanov EA (2007) **New Rhythmic Changes in Mitosis and Growth in Low Differentiated Green and Red Marine Macroalgae.** *Russ J Mar Biol* 33:207–212

- Kitajima M, Butler WL (1975) **Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone.** *Biochim Biophys Acta* 376:105-115
- Labra M, Bernasconi M, Grassi F, De Mattia F, Sgorbati S, Airoidi R, Citterio S (2007) **Toxic and genotoxic effects of potassium dichromate in *Pseudokirchneriella subcapitata* detected by microscopy and AFLP marker analysis.** *Aquat Bot* 86:229-235
- Lichtenthaler HK (1987) **Chlorophylls and carotenoids : pigments of photosynthetic biomembranes.** In : Packer L, Douce R, *Methods in enzymology*, Vol 148. Academic Press, London, p 350-382.
- Mallick N, Mohn FH (2003) **Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress research: a case study with the green microalga *Scenedesmus*.** *Ecotox Environ Saf* 55:64-69
- Mohanty P, Allakhverdiev SI, Murata N (2007) **Application of low temperatures during photoinhibition allows characterization of individual steps in photodamage and the repair of photosystem II.** *Photosynth Res* 94:217-224
- Moriyama T, Terasawa K, Sekine K, Toyoshima M, Koike M, Fujiwara M, Sato N (2010) **Characterization of cell-cycle-driven and light driven gene expression in a synchronous culture system in the unicellular rhodophyte *Cyanidioschyzon merolae*.** *Microbiology* 156:1730-1737
- Perreault F, Ait Ali N, Saison C, Popovic R, Juneau P (2009) **Dichromate effect on energy dissipation of photosystem II and photosystem I in *Chlamydomonas reinhardtii*.** *J Photochem Photobiol B* 96:24-29
- Rodriguez MC, Barsanti L, Passarelli V, Evangelista V, Conforti V, Gualtieri P (2007)

Effects of chromium on photosynthetic and photoreceptive apparatus of the alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Environ Res 105:234-239

Saha R, Nandi R, Saha B (2011) **Sources and toxicity of hexavalent chromium.** J Coord Chem 64:1782-1806

Swaminathan P, Venugopal R, Mallayan P, Lakshmanan U (2009) **Chromium-induced in vivo DNA changes in marine algae *Oscillatoria willei* BDU 130511 (Cyanophyta).** Int J Algae 11:395-402

Spudich J, Sager R (1980) **Regulation of the *Chlamydomonas* cell cycle by light and dark.** J Cell Biol 85:136-145

Strasser BJ, Dau H, Heinze I, Senger H (1999) **Comparison of light induced and cell cycle dependent changes in the photosynthetic apparatus: A fluorescence induction study on the green alga *Scenedesmus obliquus*.** Photosynth Res 60: 217-227

Szivak I, Behra R, Sigg L (2009) **Metal-induced reactive oxygen species production in *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae).** J Phycol 45:427-435

Zayed AM, Terry M (2003) **Chromium in the environment: factors affecting biological remediation.** Plant Soil 249:139-156

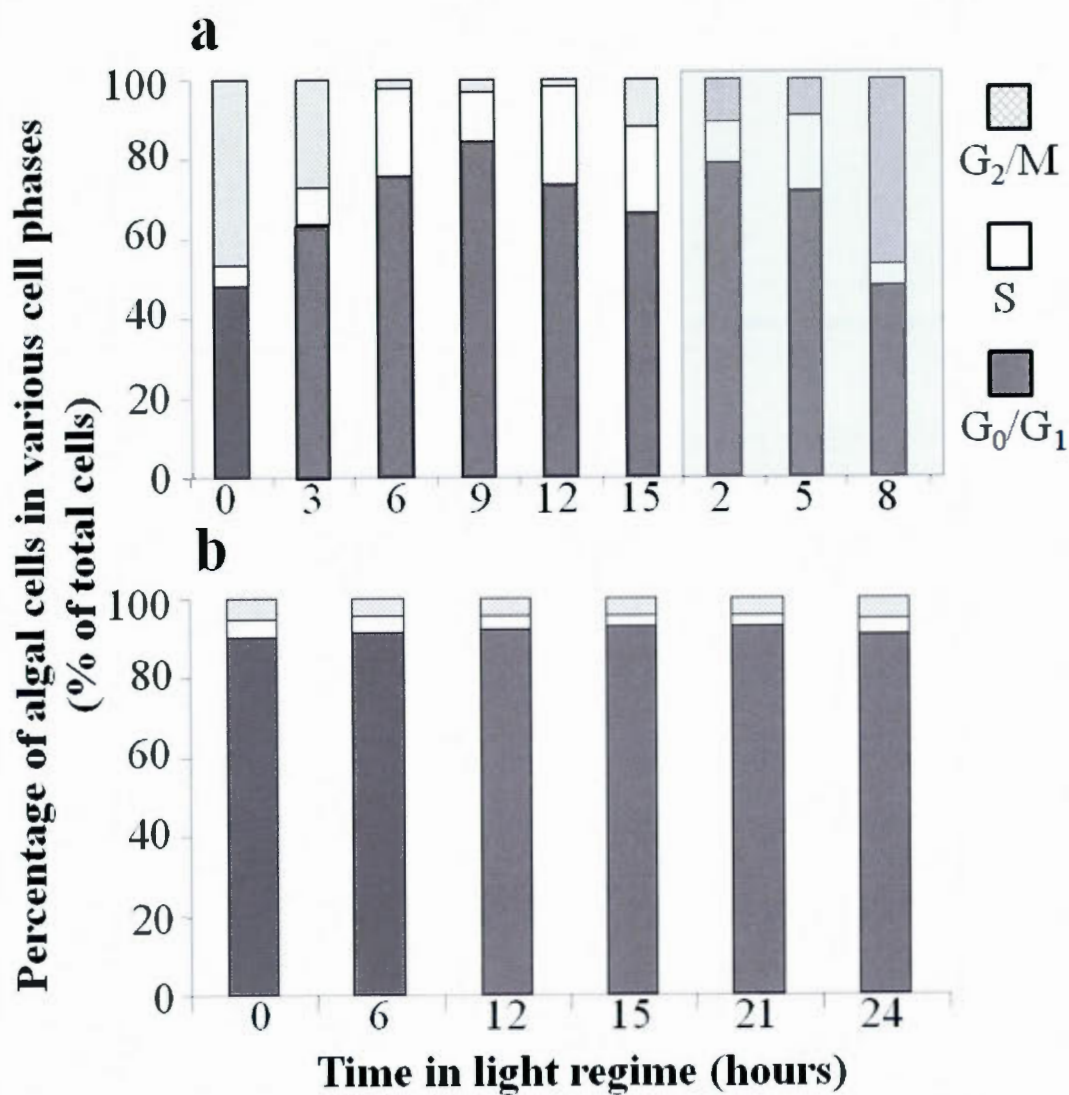


Figure 4.36: Figure 1: Ratio of the cell population (10,000 cells) under the different cell cycle phases (G_0/G_1 , S and G_2/M) for algal cells grown under a light regime of 16 h light and 8 h of darkness (a) and under continuous illumination (b). The shaded background of the top figure represents the darkness period.

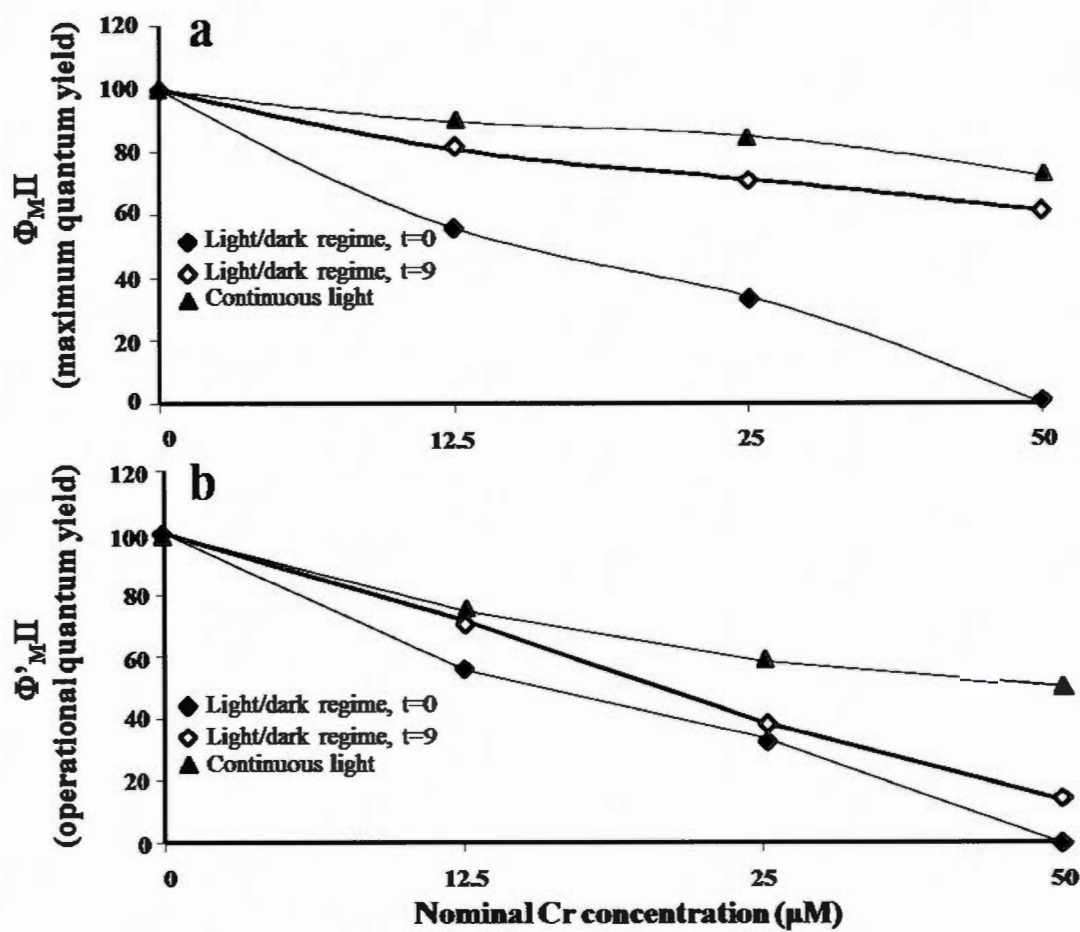


Figure 4.37: Change of PSII maximum quantum yield Φ_{MII} (a) and PSII operational quantum yield Φ'_{MII} (b) when algal cells grown under different light regimes were exposed to Cr.

Chemical species	Nominal Cr concentration (μM)		
	12.5	25	50
CrO_4^{2-}	86.94	84.22	84.32
HCrO_4^-	8.52	11.09	10.27
$\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$	0.91	0.31	0.54
CaCrO_4 (aq)	0.11	0.17	0.15
KCr_2O_7^-	0.05	0.02	0.04
$\text{CrO}_3\text{HPO}_4^{2-}$	0.21	0.32	0.28
KCrO_4^-	3.25	3.86	4.38

Tableau 2: Distribution of the different Cr species (% of total Cr) in the HSM medium for the different Cr concentrations used. Cr speciation was calculated with the Visual MINTEQ 3.0 chemical equilibrium software.

CHAPITRE V

**ALTERATION OF PHOTOSYSTEM II ACTIVITY BY ATRAZINE TOXICITY
EFFECT ON *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* SYNCHRONIZED AND
ASYNCHRONIZED CELL CYCLE CULTURES**

Olivier Didur, David Dewez, Radovan Popovic*

Department of Chemistry, University of Quebec in Montreal. C.P. 8888, Succ.
Centre-Ville, Montreal. Quebec, H3C 3P8 Canada.

Corresponding author: Radovan Popovic, email: popovic.radovan@uqam.ca. Phone
number: 514-987-3000, ext. #8467. Fax: 514-987-4054

5.1 Résumé

L'effet inhibitrice de l'atrazine sur l'activité du photosystème II (PSII) chez l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* a été étudié durant les différentes phases du cycle cellulaire (G_0/G_1 , S et G_2 / M). La croissance des algues a été maintenue sous une illumination constante continue ou sous un cycle de lumière/obscurité (16h/8h) pour obtenir une population homogène en cycle cellulaire. Les phases du cycle cellulaire de la population algale ont été déterminées grâce au contenu en ADN de chaque cellule par cytométrie en flux. Sous différente phase du cycle cellulaire, l'activité de photosynthétique a été étudiée suite à un traitement de 24 heures à différentes concentration d'atrazine (10, 100, 1000 μ M). Grâce à la méthode du PAM et du PEA, les paramètres de la fluorescence chlorophyllienne ont permis d'analyser l'activité du PSII. Dans cette étude, nous avons constaté que la toxicité de l'atrazine a été altérée par la présence des phases du cycle cellulaire et la période d'illumination. Les algues sous le cycle lumière-obscurité ont montré une inhibition de la chaîne de transport d'électrons et une augmentation de la dissipation d'énergie sous forme de chaleur par les centres réactionnels du PSII. Les algues croissant sous une illumination constante se sont avérés être plus tolérante à l'atrazine que ceux de croissance sous cycle lumière-obscurité.

5.2 Abstract

Atrazine inhibition of photosystem II (PSII) activity was investigated in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* during different state of the cell cycle. Algal cultures were maintained under continuous light or under light/dark cycle (16/8 h) to obtain homogenized cell cycle distribution. The cycle state of algal population was determined by the DNA content using flow cytometry and defined as newly divided cells before the initiation of DNA replication (G_0/G_1) and cells at the end of the replication cycle with fully duplicated DNA content (G_2/M). Under different synchronized states of the cell population, photosynthetic activity was investigated after a 24 h treatment to 10, 100 and 1000 μM of atrazine by using fluorescence parameters related to PSII activity measured with Plant Efficiency Analyzer and Pulse-Amplitude Modulated methods. In this study, we found that atrazine toxicity effect was different depending to cell cycle phases and the period of illumination. Algal cells under light-dark cycle showed an inhibition of the PSII electron transport leading to an increase of heat energy dissipation by PSII reaction center. Algal cells grown under continuous light was shown to be more resistant to atrazine than cells grown under light-dark cycle.

Keywords: green alga, cell cycle, chlorophyll fluorescence, photosynthesis, *Chlamydomonas reinhardtii*.

5.3 Introduction

Plant cell division is passing through different states which are synchronized as a cycle (Dewitte and Murray 2003). This process, known as mitosis, was found to be composed of the four following transition states named as G_1 , S, G_2 and M phases. During the mitosis process, the initiation of the G_1 state is characterized by intensive metabolite processing such as proteins and carbohydrates synthesis (Hagiwara et al. 2002). The G_1 growth state is followed by the S phase during which DNA synthesis happens. This state is initiated by the condensation of the nuclear DNA into the chromosome structure. The end of DNA duplication leads to the second growth state, G_2 during which the control of the replication of all DNA happens and the last state named as M phase is leading to cell division. Consequently, cell mitosis (M) will lead to the creation of daughter cells with complete functional cellular systems. Priority exposure to light appears to be necessary to trigger the beginning of G_1 state leading to the initiation of mitosis process in algae (Hagiwara et al. 2002). During those processes associated with mitosis, the photosynthetic apparatus is passing through changes: During the G_1 phase, it has been shown that there is an increase of phosphorylation of thylakoid membrane (Hagiwara et al. 2002). Thylakoid phosphorylation is known to be part of the molecular process involving the synthesis of chlorophyll-proteins complexes of the light harvesting complexes and the repair of active PSII reaction centers (Heil and Senger 1986; Kaftan et al. 1999). Therefore, the determination of those specific states during algal cell cycle can be done by the evaluation of DNA quantity inside the nucleus. The amounts of DNA found in each cell during the cycle vary considerably from the G_1 , S, G_2 and M phases. In the G_1 phase, the quantity of DNA is equal to the number of chromosome (n) and during the S phase the quantity will increase from n to $2n$. By using this method, we distinguished the algal cell population in G_2 and M phases since both are characterized by the same amount of DNA ($2n$) (Farinas et al. 2006).

The unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* has been widely used in the past as an experimental model to study many aspects of cellular and biochemical mechanisms. The reason is that this green alga provides many advantages to work in laboratory conditions (Harris 1998). This alga can be easily manipulated in the laboratory with a rapid growth and minimal nutritional requirements. The vegetative cell cycle is very simple in which cells stay in haploid state. This cell cycle is regulated by a circadian clock. After dark adaptation, algal culture of *C. reinhardtii* exposed to light regime passes through different synchronized state of mitosis which affects photosynthesis function (Harris 1998). Culture synchronization using light/dark cycles was used in the past for different species such as *Chlamydomonas*, *Chlorella*, *Euglena* and picoeukaryotes (Spudich and Sager 1980; Yee and Bartholomew, 1988; Jacquet 2001; Bisova et al. 2005). Studies have shown that, although light was an absolute requirement to induce cell growth, cellular division itself was independent of illumination when algal cells have reached its minimal threshold value, but a progressive increase of the illumination period was shown to induce an increase of the cell cycle division (Farinas et al. 2006). During vegetative cell growth of the green algae *C. reinhardtii*, algal cells can divide once per day and cytokinesis is beginning at the time of the light-dark transition. Under light/dark cycles of 12/12, 14/10 or 16/8 hours, cells are remained in G1 state during the light period and divide during the dark phase (Harris 2001).

When algal cells are passing through mitosis, a change in the light regime can modify the duration of the cell cycle phases (Vítová et al. 2011). The population of algal culture during those states of the cell cycle will have heterogeneous composition. It is most likely that a change in the light regime will affect algal cell division and photosynthetic processes related to functional and structural properties of the photosystem II. Indeed, it has been previously shown that the photosynthetic activity of synchronous grown cells culture was varied during different light regime (Strasser 1999). By using different light regime (duration of light and dark cycle), it is possible

to modify the cell community distribution within the G₁, S, G₂ and M states. Therefore, heterogeneous population of algal culture will cause a problem of reproducibility for different experimental research setup such as toxicological investigation.

Atrazine has been found to inhibit photosynthesis process at low concentration which was closely associated with the inhibition of photosystem II (PSII) electron transport (De la Torre and Burkey 1992; Tang et al. 1997; El Jay et al. 1997; Van der Heever and Groggelaar 1998; Bi Fai et al. 2007; Chalifour et al. 2009). It was determined that atrazine inhibitory site is located on the D1 protein of PSII, blocking electron transfers from the quinone A (Q_A) to the quinone B (Q_B), respectively the primary and the secondary electron acceptors of PSII (Diner and Petrouleas 1987). Such inhibition of PSII photochemistry by atrazine was well described in many studies by using the change of chlorophyll (Chl) fluorescence yield indicating alterations of PSII electron transport and proton gradient formation (Brack and Frank 1998; Dorigo and Leboulanger 2001; Chalifour et al. 2009). Photo-inhibitory effect induced by atrazine toxicity will affect the entire physiological state and the cell growth process (Bi Fai et al. 2007). Other studies have reported that atrazine could have an effect on the DNA content of cells, causing a stop during the S phase that leads to an impairment of the cell division (Powell et al. 2011; Mills 1998; Freeman et al. 2006).

In this study, we attempt to determine the dependence between cell cycle phases under different light regimes and the change of PSII activity when the green algae *Chlamydomonas reinhardtii* was exposed to atrazine. The rapid rise of Chl fluorescence emission was used as a reliable biomarker of atrazine toxicity effect on PSII photochemical reactions. This study will help provide a better understanding of the sensibility of algal cells in toxicological assays.

5.4 Materials and methods

5.4.1 Algal culture

The wild-type strain CC-125 of the green algae *C. reinhardtii* was obtained from the *Chlamydomonas* Genetic Center (Duke University, Durham, NC). Algal cells were growing on batch culture of 100 ml of high salt medium (HSM, Harris 1989) under continuous illumination ($100 \pm 25 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) continuous or with light/dark cycle of 16/8 hours. Light irradiance was provided by white fluorescent lamps (Sylvania GroLux F 36 W) and the temperature was controlled at $27 \pm 1^\circ\text{C}$. The algal culture was placed on an orbital shaker (120 rpm) and permanently aerated to maintain constant CO_2 supply for the growing medium. When the algal culture was in the exponential growth phase, a sample having a cell density of 5×10^7 cells ml^{-1} was used for different analytical methodologies.

5.4.2 Atrazine treatments

Algal cells in the exponential growth phase were used for atrazine treatments. For cultures synchronized to a light/dark cycle, algal cells were taken either at the end of the dark period, before the onset of illumination (L/D t=0) or after 6h of illumination (L/D t=6) to obtain different states of the cell cycle. Culture cell density was adjusted to 1×10^6 cells ml^{-1} for all treatments and exposed 24 h to 0, 10, 100 or 1000 μM atrazine. Treatments were realized under the same conditions as for culture growth (see section 2.1), in 100 ml volumes using 250 ml Erlenmeyer flasks.

5.4.3 Cell growth and chlorophyll determination

Algal cell density was determined by using a Multisizer 3 Coulter Counter (Beckman Coulter). Total Chl extraction was done in 100 % of methanol at 65°C and quantitative determination was done according to Lichtenthaler (1987).

5.4.4 Flow Cytometry Analysis

Algal samples having 2 μg of total Chl were centrifuged to remove the media and fixed in 70 % ethanol (Sigma-Aldrich) over night at 4 °C. Flow cytometry analysis was performed on a Facscan flow cytometer (Becton Dickinson Instruments). Algal cells were separated from cellular debris or noncellular particles on the basis of particle size (FSC-H) and particle granularity (SSC-H). Cells were stained with the green fluorescent dye SYBR green I as in Farinas et al (2006). The dye was diluted 1:3000 from the manufacturer's stock solution (Molecular Probe) and cells were incubated 15 min before analysis. SYBR green binds to double-stranded DNA and has a fluorescence emission centered around 520 nm. Cell cycle analysis was done on 10,000 cells with the Modfit software (Farinas et al. 2006). Using this approach, the cell population was separated in haploid cells (n , G_0/G_1), diploid cells ($2n$, G_2/M) and cells in the DNA synthesis phase, having an intermediate amount of DNA (S). The separation of the three cell population is represented in figure 1.

5.4.5 Determination of chlorophyll *a* fluorescence parameters

Prior to fluorescence measurements, treated algal samples were dark-adapted for 15 min to obtain oxido-reduction equilibrium of PSII-PSI electron transport carriers. Sample of algal cells (8 μg of Chl *a*) were uniformly placed on 13 mm glass fiber filter (Millipore #AP20 013 00) by using low pressure filtration. A Handy-Plant Efficiency Analyser fluorometer (Hansatech[®] Ltd., UK) was used to measure the rapid and polyphasic Chl *a* fluorescence kinetic during 1 s induced by a saturating light (3500 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Fluorescence yield (F) at investigated fluorescence transients was determined according to Strasser et al. (2004). The fluorescence yield at 50 μs was considered as O transient ($F_{50\mu\text{s}}$) when all reaction centers of PSII are open. The maximal fluorescence yield, F_M was determined at P transient and variable fluorescence yields related to J and I transients were determined at 2 ms and 30 ms,

respectively. The increase of fluorescence yield at 300 μs was found to be caused by an inhibition of the water splitting system showing an increase of the ratio $M_0 = (F_{300\mu\text{s}} - F_{50\mu\text{s}}) / ((F_M - F_{50\mu\text{s}}) \times 0.25)$ according to Strasser and Strasser (1995). The fluorescence yield at step J ($F_{2\text{ms}}$) is dependent on the reduction state of the PSII primary electron acceptor Q_A , therefore the ratio between the variable fluorescence yield at J transient and the maximum variable fluorescence yield was $V_J = (F_{2\text{ms}} - F_{50\mu\text{s}}) / (F_M - F_{50\mu\text{s}})$. This parameter has been used as an indicator for the efficiency of PSII primary photochemistry (Strasser and Strasser 1995). The quantum yield at P transient was evaluated as $\Phi_{P_0} = (F_M - F_{50\mu\text{s}}) / F_M$ showing PSII efficiency in reduction of plastoquinone pool (Strasser et al. 2000). According to these parameters, different parameters indicating light energy fluxes in PSII reaction centers were determined according to Strasser et al. (2000): (1) the absorption of photons (ABS) per active reaction center (RC) showing the antenna size was estimated by the ratio $\text{ABS/RC} = (M_0/V_J) / ((F_M - F_{50\mu\text{s}}) / F_M)$; (2) the non-photochemical energy dissipation per active reaction center as $\text{DI}_0/\text{RC} = \text{ABS/RC} - (M_0/V_J)$; (3) the maximal trapping rate of PSII active reaction centers $\text{TR}_0/\text{RC} = (M_0/V_J)$; (4) the electron transport beyond Q_A in PSII active reaction centers $\text{ET}_0/\text{RC} = (\text{TR}_0/\text{RC}) \times (1 - V_J)$.

Pulse-Amplitude Modulated Chl *a* fluorescence kinetics were measured simultaneously in all samples using the MAXI-Imaging PAM fluorometer system (Walz, Germany). Prior to fluorescence measurements, algal samples were dark-adapted for 15 min. Sample of algal cells (8 μg of Chl) were uniformly placed on 13 mm glass fiber filter by using low pressure filtration. Chl *a* fluorescence kinetic was measured according to Rohacek and Bartak (1999). The fluorescence F_0 , which represents basal fluorescence yield from Chl of light-harvesting complexes, was evaluated by using a modulated light with a low intensity ($1 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) to avoid the reduction of PSII primary electron acceptor, Q_A . The maximal fluorescence yield, F_M , was induced by a 0.8 s saturating pulse of blue light (460 nm, $5000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), causing maximal

reduction of PSII. The value of F_S was determined at the steady state of variable fluorescence obtained when algal samples were exposed (10 min) to continuous actinic light ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). The maximal fluorescence yield, F'_M , was determined by application of a saturating light ($5000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 0.8 s duration) at steady state of fluorescence when plants were exposed to continuous actinic light. According to Genty et al. (1989), the operational quantum yield was determined as the ratio $\Phi'_{MII} = (F'_M - F_S) / F'_M$. The non photochemical, non regulated energy dissipation was determined as the ratio $\Phi_{NO} = 1 / (([F_M - F'_M] / F'_M) + 1 + (((F'_M - F_S) / (F'_M - F'_O)) [F'_O/F]) (F_M/F_O - 1))$, according to Kramer et al. (2004).

5.4.6 Data analysis and statistic

The experiments were done in three replicates for all treatments. Means and standard deviation were estimated for each treatment. Significant differences between controls and atrazine treated samples were determined by using Student's t-test, where P value less than 0.05 was considered to be significant.

5.5 Results and Discussion

By using different light regimes, the synchronization of the cell cycle in *C. reinhardtii* cultures was altered. The proportion of cells in the different cell cycle state was determined by measuring the DNA content of cells using flow cytometry (Figure 1). Under continuous light, the algal population was characterized by a very high proportion of cells (90 %) in the G_0/G_1 phase through all the day (Figure 1). In a light/dark cycle of 16/8 hours, the cell cycle proportion changed during the day. The maximum proportion of cells in the G_2/M was found just before the onset of illumination (L/D $t=0$). At this time, 45 % of cells were in the G_2/M state, 50 % in the G_1 state and 5 % in the S state (Figure 1). After 6 h of illumination, a decrease of the number of cell in the G_2/M state was observed, with a concomitant increase of the cells in the S and G_0/G_1 states, up to 6 h of illumination (L/D $t=6$), where the proportion of G_2/M cells was at its minimum (Figure 1). Using these conditions, three different state of the cell cycle were selected: cells under continuous light (mostly in G_0/G_1 state), cells under light/dark cycle (16/8 hours) at $t = 0$ h of illumination (L/D $t=0$, highest proportion of G_2/M) and at $t = 6$ h of illumination (L/D $t=6$, having a maximum of cells in G_0/G_1 state for light/dark grown cells) (Figure 1). These cell populations will be referred as continuous, L/D $t=0$ and L/D $t=6$, respectively, in the text.

Atrazine toxicity effect was evaluated under different cell cycle distribution using Chl *a* fluorescence measurement. This methodological approach was previously shown to be very sensitive to the effect of PSII inhibitors (Ralph 2000; Macinnis-Ng and Ralph 2003; Juneau et al. 2007). The change of PSII primary photochemical reactions by atrazine effect was shown by the alteration of the rapid Chl *a* fluorescence kinetic induced by a saturating flash (Figure 2). After 24 h of treatment to 100 μ M of atrazine, the shape of the fluorescence rise was distinctly altered for algal cultures in the G_0/G_1 and G_2/M states, showing a plateau at the J transient, and a

strongly diminished fluorescence yield for the I and P transient (Figure 2). This effect can be attributed to the inhibition of electron transport to the Q_B electron acceptor, resulting in the accumulation of reduced Q_A and consequently an increase of fluorescence emission at the J level compared to the I and P transient (Hiraki et al. 2003). Inhibition of PSII electron transport was not complete at 100 μ M and the increase of variable Chl fluorescence at the P transient indicate that a fraction of the PSII reaction centers were not altered by atrazine effect (Chalifour and Juneau 2011). On the other hand, when algal cells grown under continuous illumination were exposed during 24 h to 100 μ M of atrazine, most of the PSII reaction centers were not affected by atrazine effect and PSII electron transport was still active. (Figure 2). It is known that atrazine has a lower binding affinity for illuminated PSII than dark-adapted PSII (Jursinic and Stemler 1983) and therefore, under continuous illumination, atrazine toxicity may be reduced. The different effect of atrazine under continuous light-grown and light/dark cycle-grown algal cultures indicates that the physiological states of algal cells may be different under the different light regimes.

The change of different fluorescence parameters related to the energy fluxes within the photosynthetic apparatus may provide further information on the effect of atrazine on PSII electron transport (Chalifour and Juneau 2011). Synchronized and asynchronized cultures of *C. reinhardtii* showed differences in those parameters when exposed to atrazine effect (Figure 3). Under continuous illumination, algal cells were slightly affected by the presence of atrazine by concentrations up to 100 μ M and no significant variations of PSII electron transport processes, indicated by parameters ABS/RC , DI_0/RC , TR_0/RC and ET_0/RC , were found after 24 h of exposure. At 1000 μ M, atrazine effect induced an increase of the antenna size per active PSII RC (ABS/RC) and of heat energy dissipation per active PSII RC (DI_0/RC), while the electron transport rate beyond Q_A was drastically decreased (parameter ET_0/RC) (Figure 3). This alteration of energy fluxes within PSII reaction centers are in agreement with the Q_B binding site of atrazine and similar findings were obtained for

atrazine effect in different algal species (Chalifour and Juneau 2011) or in leaves of pea plants (Lambrev et al. 2003). These results indicate an accumulation of reduced Q_A caused by atrazine effect, leading to an increase of closed PSII RC and a decreased electron flux toward PSI. The excess of energy could then be dissipated through heat by inactive reaction centers.

For the light/dark cycle cultures, after 24 h of treatment to 10 μM of atrazine, both cultures showed a reduction of the parameter ET_0/RC . The L/D $t=0$ culture (maximum proportion of cells in G/M) showed a reduction of the electron transport of 12 %, while the L/D $t=6$ culture (maximum of G_0/G_1 cells) showed a reduction of 30 %. After 24 h of treatment to 100 μM atrazine, this effect increased to 48 % and 60 % for the L/D $t=0$ and L/D $t=6$ cultures, respectively. At 100 μM , no effect was measured for the ABS/RC and DI_0/RC parameters. The atrazine binding to Q_B reduced the oxidation rate of Q_A leading to an inhibition of the electron transfers from the PSII to PSI. After 24 h of treatment to 1000 μM atrazine, both phases showed complete inhibition of PSII electron transport and a strong increase of the parameter DI_0/RC was found. Under those conditions, heat energy dissipation was higher for algal cells exposed after 6h of illumination (L/D $t=6$). These results may suggest that in synchronized cultures, PSII electron transport was more sensitive to the presence of atrazine in cells in the G_0/G_1 phase than those in the G_2/M phase. This may be related to the dependency of the G_1 phase to photosynthetic electron transport, while the final steps of cell division (G_2/M phases) are independent of light and photosynthesis (Spudich and Sager 1980).

The alteration of PSII electron transport activity by atrazine effect was investigated by the change in the PSII operational quantum yield (Φ'_{MII}) parameter (Ralph et al. 2000; Bi Fai et al. 2007). For all cultures, Φ'_{MII} was decreased by atrazine effect after 24 h of exposition, and Φ'_{MII} was reduced to 0 at 1000 μM for all conditions (Figure 4). A decrease of Φ'_{MII} was also observed in different algal species

(*Navicula* sp., *Nephroselmis pyriformis*, *Selenastrum capricornutum*, *Navicula pelliculosa*, *Microcystis aeruginosa*) exposed to atrazine effect (Bi Fai et al. 2007; Magnusson et al. 2008; Chalifour and Juneau 2011) and complete inhibition of Φ'_{MII} by atrazine effect was observed in *Nephroselmis pyriformis* after 3 days of treatment to 1 μ M atrazine (Magnusson et al. 2008). For *C. reinhardtii* cultures under light-dark synchronized conditions, cells were slightly more sensitive to atrazine effect when exposed after 6 h of illumination (L/D t=6, high proportion of G₀/G₁) then when exposed at the end of the dark period (L/D t=0, 50% of cells in G₂/M phase). For a 24 h treatment to 100 μ M atrazine, Φ'_{MII} was decreased to 21 % of control in cultures exposed at the end of the dark period while cultures exposed after 6h of illumination showed a Φ'_{MII} of 9% of control sample. On the other hand, when cultures grown under continuous illumination were exposed to atrazine, the decrease of photosynthetic activity, indicated by the Φ'_{MII} parameter, was less important than in cultures synchronized to the light-dark cycle. Algal grown under continuous light showed a decrease of 20 % of Φ'_{MII} compared to control, after 24 h treatment to 100 μ M of atrazine. Concomitantly, non-regulated non-photochemical energy dissipation (Φ_{NO}), as an indicator of inactive PSII reaction centers dissipating energy as heat, was increased by atrazine effect. Φ_{NO} showed an increase for algal cells grown under a light-dark regime after a 24 h treatment of atrazine while, under continuous illumination, Φ_{NO} remained stable until the concentration of 1000 μ M of atrazine after which it increased slightly by 50 %.

The toxicity of 24 h treatment of atrazine was found to be altered by the different light period used during this experiment. In synchronized cultures, such differences may be associated with the cell cycle phases found in the culture at the moment of exposition. Algal cells in the G₀/G₁ phase were slightly more sensitive to the presence of atrazine as early has to 10 μ M of atrazine. This sensitivity may be explained by the fact that cells in the G₂/M phase do not need energy to go through the cell division and protein synthesis *de novo* for the PSII (Spudich and Sager 1980). In

addition, algal cells grown in light/dark cycle, independently of cell cycle, were found to be more affected by treatment to atrazine than cells grown under continuous light. Illumination is known to participate in the modulation of atrazine toxicity in algal cells, either by changing the cellular state of the cell (Guasch and Sabater 1998) or by reducing atrazine affinity for its inhibitory site (Jursinic and Stemler 1983). PSII activity, when exposed to stress, is also regulated by the illumination due to the important role of light in the PSII repair process (Polle and Melis 1999), which may allow cells under continuous light to adapt more easily to the presence of atrazine. Further studies should be done to better understand the complex relationship between light, cell cycle regulation and pollutants inhibitory effects in algae in order to evaluate how it may affect ecotoxicological testing of environmental contaminants.

5.6 Acknowledgments

This work was supported by research grants awarded to R. Popovic by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). F. Perreault is supported by a NSERC PhD fellowship.

5.7 References

- Bi Fai, P., Grant, A., Reid, B. 2007. **Chlorophyll *a* fluorescence as a biomarker for rapid toxicity assessment.** *Environmental Toxicology and Chemistry* 26: 1520-1531.
- Bisova, K., Krylov, D.M., Umen, J.G. 2005. **Genome-wide annotation and expression profiling of cell cycle regulatory genes in *Chlamydomonas reinhardtii*.** *Plant Physiology* 137: 475-491.
- Brack, W., Frank, H. 1998. **Chlorophyll *a* fluorescence: A tool for the investigation of toxic effects in the photosynthetic apparatus.** *Ecotoxicology and Environmental Safety* 40: 34-41.
- Chalifour, A., Spear, P., Boily, M.H., DeBlois, C., Giroux, I., Dassylva, N., Juneau, P. 2009. **Assessment of toxic effects of pesticide extracts on different green algal species by using chlorophyll *a* fluorescence.** *Toxicology and Environmental Chemistry* 91: 1315-1329.
- Chalifour, A., Juneau, P. 2011. **Temperature-dependent sensitivity of growth and photosynthesis of *Scenedesmus obliquus*, *Navicula pelliculosa* and two strains of *Microcystis aeruginosa* to the herbicide atrazine.** *Aquatic Toxicology* 103: 9-17.
- De la Torre, W.R., Burkey, K.O. 1992. **Physiological effects of sublethal atrazine on barley chloroplast thylakoid membranes.** *Photosynthesis Research* 32: 1-10.
- Dewitte, W., Murray, J.A. 2003. **The plant cell cycle.** *Annual Review of Plant Biology* 54: 235-264.
- Diner, B.A., Petrouleas, V. 1987. **Q₄₀₀, the non-heme iron of the photosystem II iron-quinone complex. A spectroscopic probe of quinone and inhibitor binding to the reaction center.** *Biochimica & Biophysica Acta* 895: 107-125.

- Dorigo, U., Leboulanger, C. 2001. **A pulse-amplitude modulated fluorescence-based method for assessing the effects of photosystem II herbicides on freshwater periphyton.** *Journal of Applied Phycology* 13: 509-515.
- El Jay, A., Ducruet, J.-M., Duval, J.-C., Pelletier, J.P. 1997. **A high-sensitivity chlorophyll fluorescence assay for monitoring herbicide inhibition of photosystem II in the chlorophyte *Selenastrum capricornutum*: Comparison with effect on cell growth.** *Archives of Hydrobiology* 140: 273-286.
- Farinas, B., Mary, C., de O Manes, C., Bhaud, Y., Peaucellier, G., Moreau, H. 2006. **Natural synchronisation for the study of cell division in the green unicellular alga *Ostreococcus tauri*.** *Plant Molecular Biology* 60: 277-292.
- Freeman, J., Rayburn, A. 2006. **Aquatic Herbicides and Herbicide Contaminants: In vitro Cytotoxicity and Cell-Cycle Analysis.** *Environmental Toxicology* 21: 256-263.
- Genty, B., Briantais, J.M., Baker, N.R. 1989. **The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence.** *Biochimica et Biophysica Acta* 990: 87-92.
- Guasch, H., Sabater, S. 1998. **Light history influences the sensitivity to atrazine in periphytic algae.** *Journal of Phycology* 34:233-241.
- Hagiwara, S.Y., Bolige, A., Zhang, Y., Takahashi, M., Yamagishi, A., Goto, K. 2002. **Circadian gating of photoinduction of commitment to cell-cycle transitions in relation to photoperiodic control of cell reproduction in *Euglena*.** *Photochemistry and Photobiology* 76: 105-115.
- Harris, E.H. 1989. **The *Chlamydomonas* Sourcebook: A comprehensive guide to biology and laboratory use**, San Diego, CA, Academic Press.

- Harris, E.H. 1998. Chapter 1: **Introduction to *Chlamydomonas***. In *The molecular biology of chloroplasts and mitochondria in Chlamydomonas*, ed. J.-D. Rochaix, M. Goldschmidt-Clermont, S. Merchant, 1-11. Netherlands, Kluwer Academic Publishers.
- Harris, E.H. 2001. ***Chlamydomonas* as a model organism**. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 363-406.
- Hiraki, M., van Rensen, J.J.S., Vredenberg, W.J., Wakabayashi, K. 2003. **Characterization of the alterations of the chlorophyll a fluorescence induction curve after addition of Photosystem II inhibiting herbicides**. *Photosynthesis Research* 78:35-46.
- Heil, W.G., Senger, H. 1986. **Thylakoid-protein phosphorylation during the life cycle of *Scenedesmus obliquus* in synchronous culture**. *Planta* 167: 233-239.
- Jacquet, S., Partensky, F., Marie, D., Casotti, R., Vaultot, D. 2001. **Cell cycle regulation by light in *Prochlorococcus* strains**. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 782-790.
- Juneau, P., Qiu, B., Deblois, C.P. 2007. **Use of chlorophyll fluorescence as a tool for determination of herbicide toxic effect: Review**. *Toxicological and Environmental Chemistry* 89: 609-625.
- Jursinic, P., Stemler, A. 1983. **Changes in [^{14}C] atrazine binding associated with the oxidation-reduction state of the secondary quinone acceptor of photosystem II**. *Plant Physiology* 73:703-708.
- Kaftan, D., Meszaros, T., Whitmarsh, J., Nedbal, L. 1999. **Characterization of Photosystem II Activity and Heterogeneity during the Cell Cycle of the Green Alga *Scenedesmus quadricauda***. *Plant Physiology* 120: 433-441.
- Kramer, D.M., Johnson, G., Kiirats, O., Edwards, G.E. 2004. **New fluorescence pa-**

rameters for the determination of Q_A redox state and excitation energy fluxes. *Photosynthesis Research* 79: 209-218.

Lambrev, P., Ivanov, S., Goltsev, V. 2003. **Effects of prolonged action of sub-herbicide concentrations of atrazine on the photosynthetic function of pea plants.** *Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences* 56:59-62.

Lichtenthaler, H.K. 1987. **Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes.** *Methods in Enzymology* 148: 350-382.

Macinnis-Ng, C.M.O., Ralph, P.J. 2003. **Short-term response and recovery of *Zostera capricorni* photosynthesis after herbicide exposure.** *Aquatic Botany* 76:1-15.

Magnusson, M., Heimann, K., Negri, A.P. 2008. **Comparative effects of herbicides on photosynthesis and growth of tropical estuarine microalgae.** *Marine Pollution Bulletin* 56:1545:1552.

Mills, P.K. 1998. **Correlation analysis of herbicide use data and cancer incidence rates in California counties.** *Archives of Environmental Health* 53: 410-413.

Nguyen-Ngoc, H., Durrieu, C., Tran-Minh, C. 2009. **Synchronous-scan fluorescence of algal cells for toxicity assessment of heavy metals and herbicides.** *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72: 316-320.

Polle, J., Melis, A. 1999. **Recovery of the photosynthetic apparatus from photoinhibition during dark incubation of the green alga *Dunaliella salina*.** *Australian Journal of Plant Physiology* 26: 679-686.

Powell, E., Faldladdin, N., Rand, A., Pelzer, D., Schrunck, E., Dhanwada, K. 2011. **Atrazine exposure leads to altered growth of HepG2 cells.** *Toxicology in Vitro* 25: 644-651.

Ralph, P.J. 2000. **Herbicide toxicity of *Halophila ovalis* assessed by chlorophyll *a* fluorescence.** *Aquatic Botany* 66:141-152.

Rohacek, K., Bartak, M. 1999. **Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: basic concepts, useful parameters, and some applications.** *Photosynthetica* 37: 339-363.

Spudich, J., Sager, R. 1980. **Regulation of the *Chlamydomonas* cell cycle by light and dark.** *Journal of Cell Biology* 85: 136-145.

Strasser B.J. 1999. **Donor side capacity of Photosystem II probed by chlorophyll *a* fluorescence transients.** *Photosynthesis Research* 52: 147-155.

Strasser, R.J., Srivastava, A., Tsimilli-Michael, M. 2000. **The fluorescence transient as a tool to characterise and screen photosynthetics samples.** In *Probing Photosynthesis: Mechanism, Regulation and Adaptation*, eds M. Yunus, U. Pathre, P. Mohanty, 445-483. Bristol, Taylor & Francis.

Strasser, R.J., Srivastava, A., Tsimilli-Michael, M. 2004. Analysis of the chlorophyll *a* fluorescence transient. In *Chlorophyll Fluorescence a Signature of Photosynthesis, Advances in Photosynthesis and Respiration*, eds G. Papageorgiou, Govindjee, 321-362. The Netherlands, Kluwer Academic Publishers.

Strasser, B.J., Strasser, R.J. 1995. **Chlorophyll *a* fluorescence: a signature of photosynthesis.** in *Photosynthesis: From light to Biosphere*, ed. P. Mathis, 977-980. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.

Tang, J.-X., Hoagland, K.D., Siegfried, B.D. 1997. **Differential Toxicity of Atrazine to Selected Freshwater Algae.** *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 59: 631-637.

Van der Heever, J.A., Grogelaar, J.U. 1998. ***In vivo* chlorophyll *a* fluorescence of**

***Selenastrum capricornutum* as a screening bioassay in toxicity studies.** *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 35: 281-286.

Vítová, M., Bišová, K., Umysová, D., Hlavová, M., Kawano, S., Zachleder, V., Čížková, M. 2011. ***Chlamydomonas reinhardtii*: duration of its cell cycle and phases at growth rates affected by light intensity.** *Planta* 233: 75-86.

Yee, M.C., Bartholomew, J.C. 1988. **Light regulation of the cell cycle in *Euglena gracilis bacillaris*.** *Cytometry* 9: 387-393.

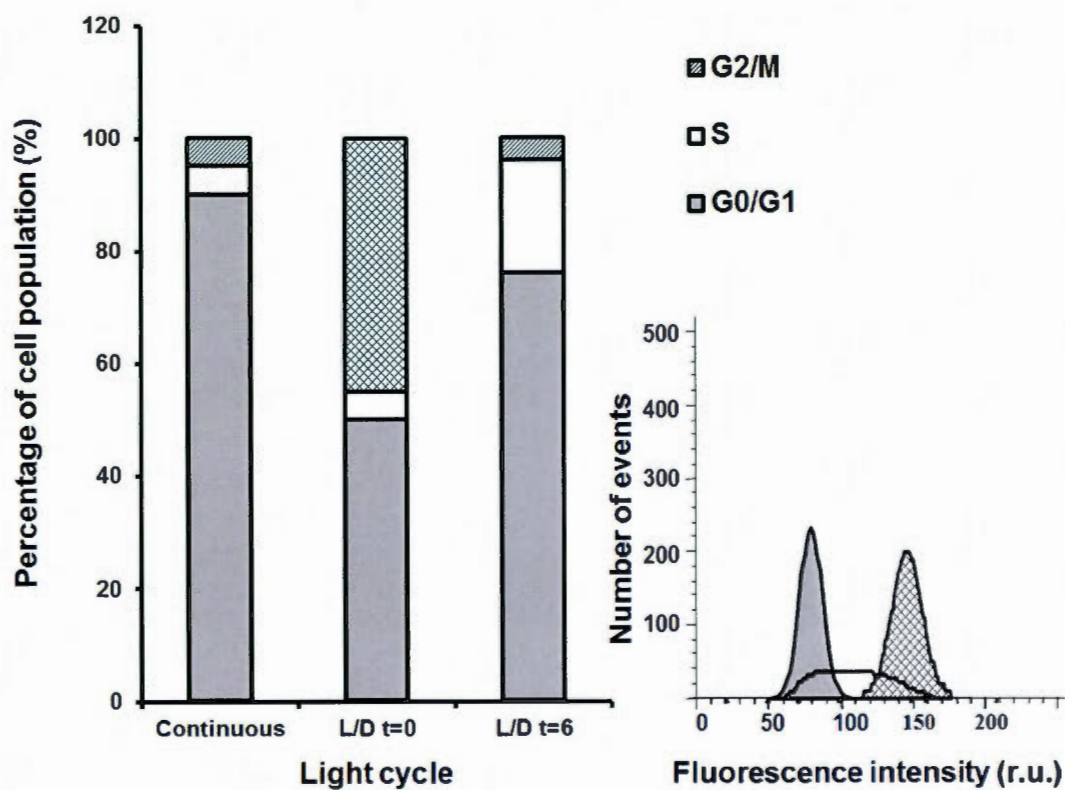


Figure 5.1: Left : Distribution of algal cell population in the G0/G1, S and G2/M phases of the cell cycle for different light regimes. L/D t=0 and L/D t=6 indicate cells grown in a light/dark cycle before the onset of illumination (t=0) or after 6h of illumination (t=6). Right: Flow cytometry separation of the cell population using the DNA binding fluorescent sensor SYBR Green (see section 2.4 for more details).

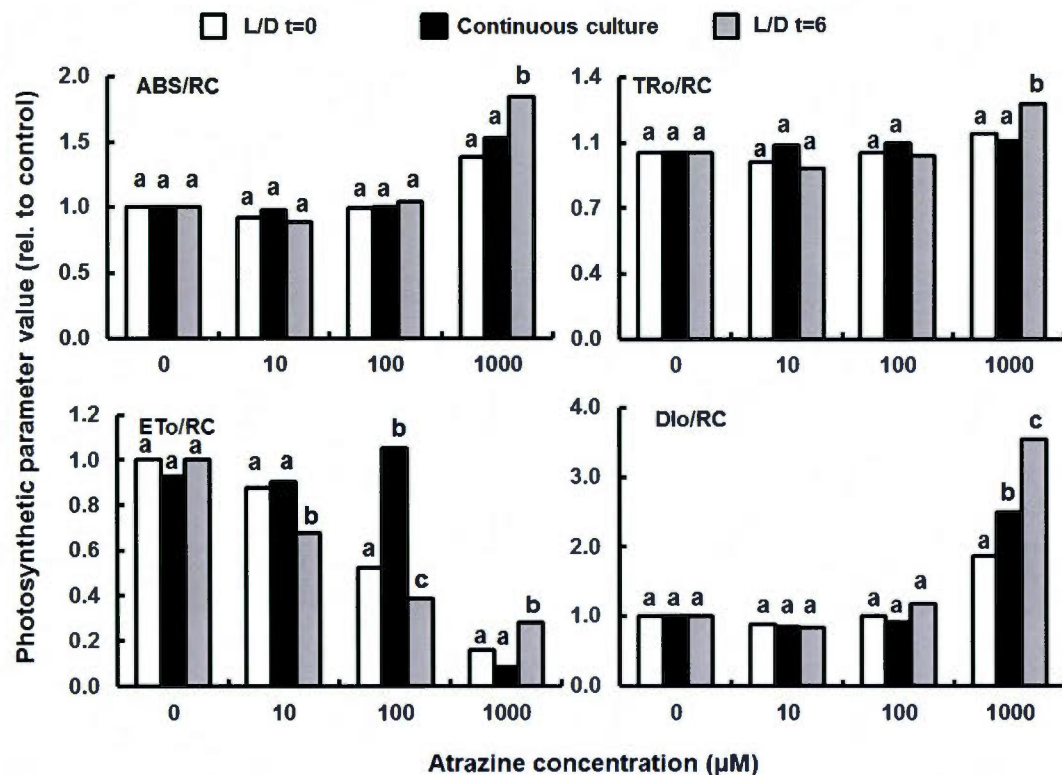


Figure 5.2: Rapid Chl a fluorescence rise in *C. reinhardtii* cultures exposed to 100 μM atrazine for 24 h. Cultures exposed to atrazine were either grown in continuous light (Atz-Cont) or in the light/dark cycle and exposed at the onset of illumination (Atz-L/D t=0) and after 6h of illumination (Atz-L/D t=6). The control sample (Ctrl) is presented for the continuous light culture (Ctrl-Cont) and the L/D cycle cultures (Ctrl-L/D).

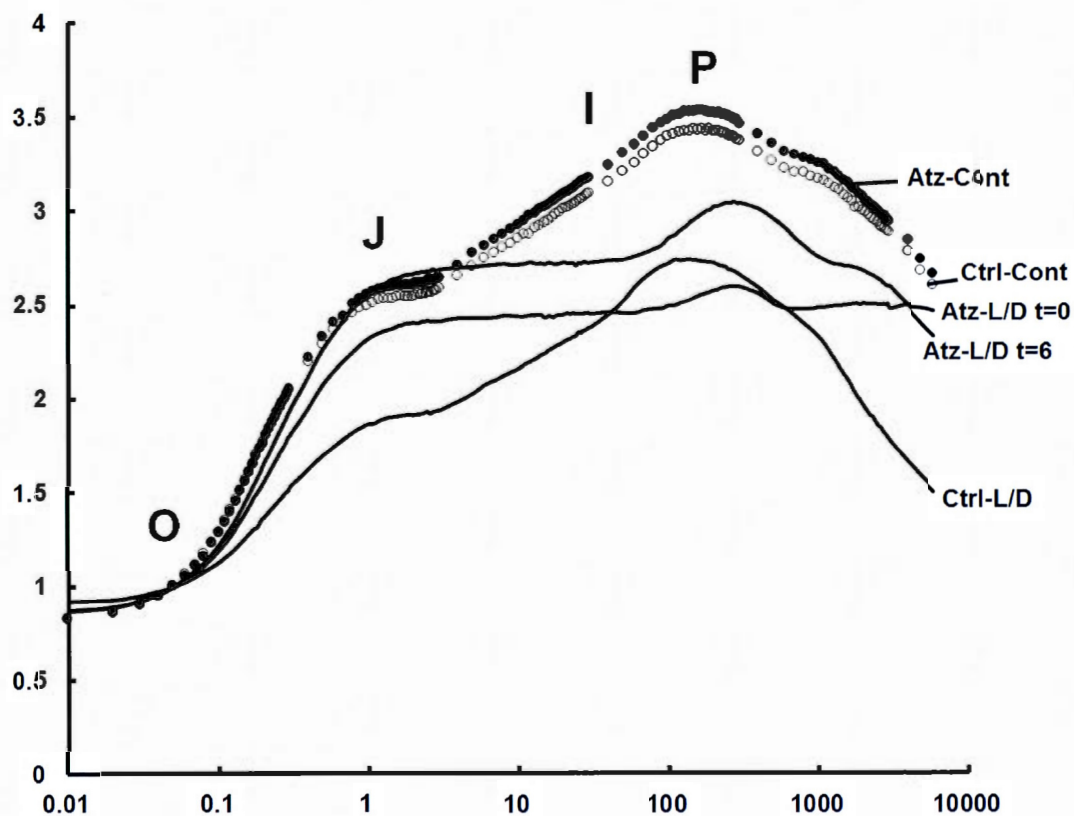


Figure 5.3: Change of the PSII energy fluxes parameters obtained from the rapid Chl *a* fluorescence rise of *C. reinhardtii* cultures exposed 24 h to atrazine. Cultures exposed to atrazine were either grown in continuous light (Atz-Cont) or in the light dark cycle and exposed the onset of illumination (L/D $t=0$) or after 6h of illumination (L/D $t=6$) (see section 2.5 for details on parameters).

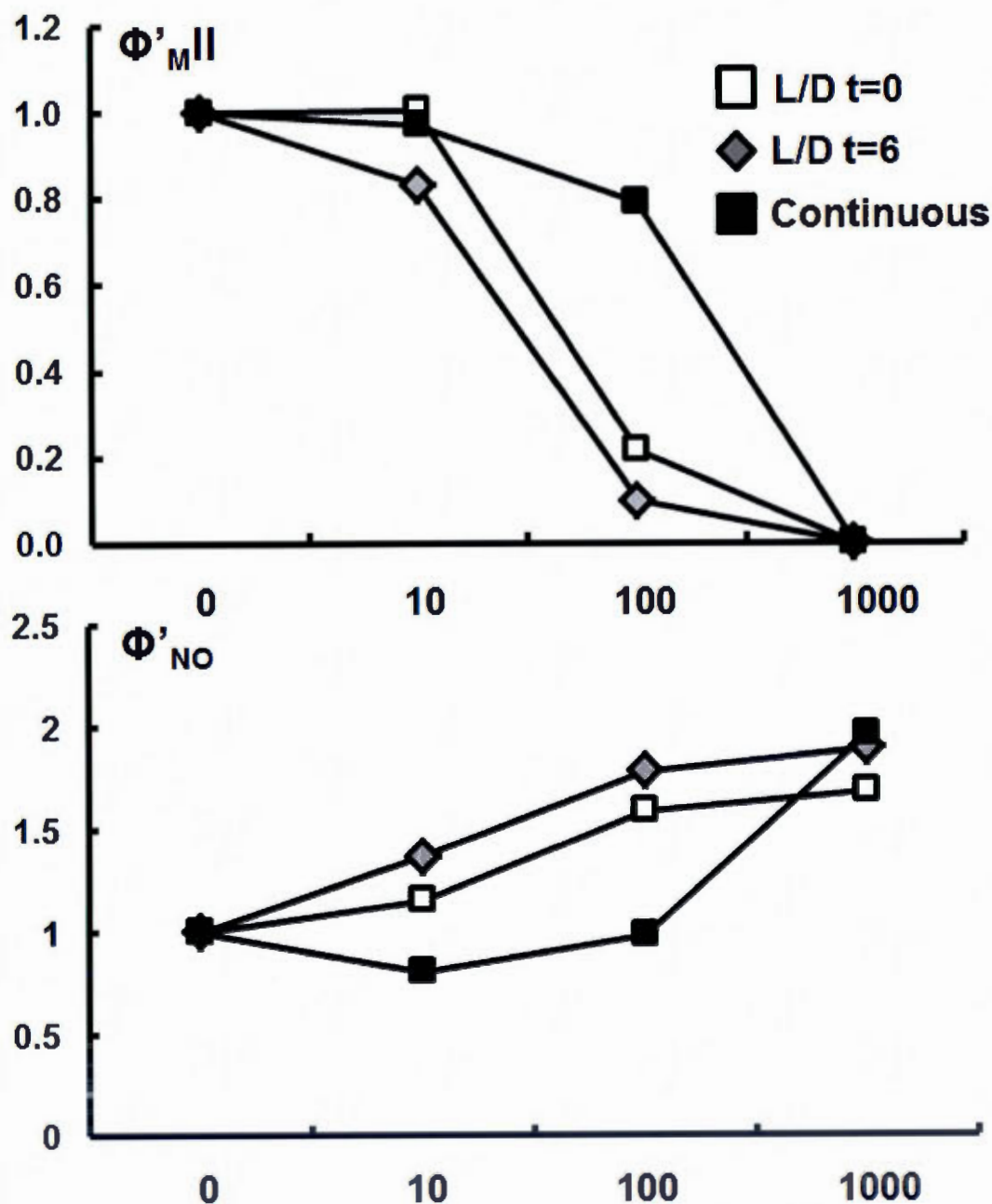


Figure 5.4: Change of the PSII energy fluxes parameters obtained from the rapid Chl *a* fluorescence rise of *C. reinhardtii* cultures exposed 24 h to atrazine. Cultures exposed to atrazine were either grown in continuous light (Atz-Cont) or in the light dark cycle and exposed the onset of illumination (L/D t=0) or after 6h of illumination (L/D t=6) (see section 2.5 for details on parameters).

CONCLUSION

Les objectifs de notre projet de recherche portaient sur l'influence possible du cycle cellulaire sur l'activité photochimique de la photosynthèse et sur la toxicité des xénobiotiques (chrome et atrazine). La fluorescence chlorophyllienne est un paramètre essentiel qui nous renseigne sur l'état et le fonctionnement de l'appareil photosynthétique. Grâce à cette méthode, il a été possible d'observer l'état physiologique d'un organisme végétal. Notre travail a contribué à approfondir et à mettre en lumière l'implication du cycle cellulaire sur les variations des propriétés structurelles et fonctionnelles des PSII dans *Chlamydomonas reinhardtii*. Dans ce projet doctoral, trois problématiques ont été étudiées chez l'algue *C. reinhardtii*: 1) Investigation de l'effet du cycle cellulaire sur la photochimie du PSII. 2) Investigation de l'altération de la toxicité du dichromate durant le cycle cellulaire. 3) Investigation de l'altération de la toxicité de l'atrazine durant le cycle cellulaire.

Dans la première partie du projet, nos résultats ont permis d'approfondir la relation entre le cycle cellulaire et les variations de l'activité photochimique. L'identification de chacune des phases du cycle cellulaire a permis d'établir leur propre photochimie relative. L'objectif était de déterminer l'influence que pouvait avoir le cycle cellulaire sur la photosynthèse du PSII. Mais aussi de comparer la photochimie de culture d'algues croissant sous un cycle de lumière continue et celles en cycle de lumière/noirceur. Pour cette partie, notre méthodologie consiste à identifier les phases du cycle cellulaire ainsi que la variabilité de celles-ci durant les cycles d'illumination. Une fois les phases identifiées, une analyse du fonctionnement de l'appareil photosynthétique a été réalisée par le PEA. Ces résultats ont été comparés à ceux obtenus sur les cultures d'algues poussant sous une illumination constante. Nos résultats ont démontré que les proportions des phases du cycle cellulaire variaient beaucoup tout au long de la journée pour les cultures d'algues

poussant sous un cycle de lumière/noirceur. Dans le cas des algues en lumière continue, les diverses proportions de phases du cycle ne subissaient presque aucune variation durant 24h. L'observation et l'interprétation des variations mesurées sur le PSII grâce aux paramètres photosynthétiques ont permis de conclure que les phases du cycle cellulaire ont un effet marqué sur le rendement photochimique du PSII. Une variation de l'ordre de plus de 10% a été observée entre les phases G_0/G_1 et G_2/M du cycle cellulaire mais aussi comparativement aux algues poussant en cycle d'illumination continue. Il nous a été alors possible de conclure que cette variation a été liée à la synthèse *de novo* de l'appareil photosynthétique suite à la division cellulaire. La lumière joue un rôle important dans la synthèse de la Chl et l'assemblage des centres RC du PSII.

Dans la deuxième partie de nos recherches, nous avons étudié l'altération de la sensibilité des cultures synchronisées et non-synchronisées en présence du dichromate. L'interprétation de nos résultats a permis d'établir les différences de toxicité entre : 1) les algues croissant en lumière continue, 2) les algues en cycle de lumière, 3) les différences de toxicité entre les phases du cycle cellulaire. Notre méthodologie, consistait à mesurer l'effet sur la photosynthèse des diverses phases du cycle cellulaire suite à une exposition de 24 heures en présence de diverses concentrations de chrome. L'utilisation de divers cycles d'illumination a permis de comparer l'effet de la toxicité du chrome entre les algues en G_0/G_1 , celles en G_2/M et en lumière continue. La toxicité du chrome a été mesurée grâce au rendement quantique maximal et opérationnel du PSII. Nous avons pu établir que les algues en G_2/M sont beaucoup plus sensibles au chrome comparativement à celles en G_0/G_1 . Par contre, les cellules poussant en cycle de lumière sont plus sensibles à la présence de ce métal lourd que celles croissant en lumière continue. Le Φ'_{PII} des algues en G_2/M était réduit à zéro, à 80% pour les algues G_0/G_1 et de seulement 60% pour les algues en lumière continue à une concentration de $50\mu M$ de chrome. Nous avons donc pu établir que le cycle cellulaire jouait un rôle important dans l'altération de la

sensibilité de l'algue en présence du chrome. La diminution de l'efficacité du système de réparation de l'appareil photosynthétique pourrait expliquer en partie les résultats obtenus. De plus, comme observé dans la partie précédente, la synthèse des photosystèmes se termine une fois la division effectuée, la présence de chrome dans le milieu à ce moment pourrait interférer selon certaines études au niveau de la synthèse de D1 et inhiberait la formation du PSII (Perreault et al. 2009).

Dans la troisième partie de nos recherches, nous avons étudié l'altération de la sensibilité chez *C. reinhardtii* sous divers cycles d'illumination en présence d'un herbicide tel que l'Atrazine. Les résultats de nos recherches ont permis d'établir l'impact du cycle cellulaire sur un inhibiteur connu de la chaîne de transport d'électrons. L'utilisation d'un cycle de lumière continue ainsi qu'un cycle d'illumination permettant la synchronisation d'une culture a permis d'établir les variabilités de la toxicité de l'atrazine. Nous avons obtenu encore une fois que les algues poussant sous une lumière continue étaient plus résistantes à la présence de contaminants. Les algues en G_0/G_1 étaient plus sensibles que celles en G_2/M lors des traitements à l'atrazine. En effet, nous avons mesuré une plus grande réduction de la chaîne de transport des électrons et une augmentation de la voie de dissipation de l'énergie sous forme de chaleur dans les algues en G_0/G_1 . La diminution de l'efficacité du rendement opérationnel du PSII était de l'ordre de 90% chez les algues en G_0/G_1 comparativement à 75% pour celles en G_2/M et de seulement de 20% pour les algues en lumière continue suite à un traitement de 24h avec 100 μ M d'atrazine.

Notre recherche nous permet de conclure que le cycle cellulaire joue un rôle important dans l'altération de la photosynthèse mais aussi sur la sensibilité face à divers xénobiotiques. L'importance des diverses phases du cycle cellulaire entraîne des modifications au niveau de la structure et de l'efficacité de l'appareil photosynthétique. La présence de xénobiotiques à des moments précis du cycle cellulaire peut avoir de lourdes conséquences sur la photochimie, mais aussi sur la

croissance d'une population d'algues. L'utilisation de cycle d'illumination a permis d'établir que bien que les études en lumière continue donnent de bons résultats reproductibles, ils ont tendance à sous-estimer la toxicité réelle des xénobiotiques. L'utilisation de culture synchronisée permet d'établir, avec une meilleure fiabilité, la toxicité réelle de produits tels que le chrome et l'atrazine. L'utilisation d'algues exposées à une illumination constante sous-estimerait la toxicité réelle de ces produits et pourrait avoir des effets néfastes sur l'environnement. Le déversement de tels produits dans l'environnement durant une phase du cycle cellulaire plus sensible pourrait entraîner des modifications à la communauté des algues et avoir des répercussions néfastes sur la chaîne trophique. De plus amples études sur l'implication du cycle cellulaire sur la formation des espèces réactives d'oxygènes ainsi que sur d'autres souches d'algues seront nécessaires afin de mieux approfondir la connaissance fondamentale de cette problématique.

AUTRES CONTRIBUTIONS

- Perreault F, Dionne J, **Didur O**, Juneau P, Popovic R.(2011) **Effect of cadmium on photosystem II activity in *Chlamydomonas reinhardtii*: alteration of O-J-I-P fluorescence transients indicating the change of apparent activation energies within photosystem II.** Photosynth Res. 107:151-157. (Participation à la partie expérimentale)
- Ait Ali N, Juneau P, **Didur O**, Perreault F, Popovic R.(2008) **Effect of dichromate on photosystem II activity in xanthophyll-deficient mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*.** Photosynth Res. 95:45-53. (Participation à la partie expérimentale)
- Dewez D, **Didur O**, Vincent-Héroux J, Popovic R.(2007) **Validation of photosynthetic-fluorescence parameters as biomarkers for isoproturon toxic effect on alga *Scenedesmus obliquus*.** Environ Pollut.; 151:93-100. (Participation à la partie expérimentale)
- Ali NA, Dewez D, **Didur O**, Popovic R.(2006) **Inhibition of photosystem II photochemistry by Cr is caused by the alteration of both D1 protein and oxygen evolving complex.** Photosynth Res. 89:81-7. (Participation à la partie expérimentale)

RÉFÉRENCES

- Ait Ali N, Dewez D, Didur O, Popovic R. 2006 **Inhibition of photosystem II photochemistry by Cr is caused by the alteration of both D1 protein and oxygen evolving complex.** Photosynth Res 89:81-87
- Ait Ali N, Juneau P, Didur O, Perreault F, Popovic R. 2008 **Effect of dichromate on photosystem II activity in xanthophyll-deficient mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*.** Photosynth Res 95:45-53
- Allen J. F. 2002. **Photosynthesis of ATP, electrons, protons pumps, rotors, and poise.** Cell., 110: 273-276.
- Apel K. and Hirt H. 2004. **Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction.** Ann. Rev. Plant Biol., 55: 373-399.
- Appenroth KJ, Stöckel J, Srivastava A, Strasser RJ. 2001 **Multiple effects of chromate on the photosynthetic apparatus of *Spirodela polyrhiza* as probed by OJIP chlorophyll a fluorescence measurements.** Environ Pollut 115:49-64
- Asada K. 1994. **Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues causes of photooxydative stress and amelioration of defence systems in plants.** Editors C. H. Foyer et P. M. Mullineaux, p 77-104. Boca Raton : CRC Press.
- Baker N. R., Harbinson J. et Kramer D. M. 2007. **Determining the limitations and regulation of photosynthetic energy transduction in leaves.** Plant, Cell and Environment, 30: 1107-1125.
- Baker NR. 2008 **Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo.**

Annu Rev Plant Biol 59:89–113

- Barber J. 1983. **Membrane conformational changes due to phosphorylation and the control of energy transfer in photosynthesis.** Photobiochem. Photobiophys., 5: 181-190.
- Barber J. et Kuhlbrandt W. 1999. **Photosystem II.** Curr. Opinion in Structural Biol., 9 469-475
- Bassi R., Rigoni F. and Giacometti G. M. 1990. **Chlorophyll binding proteins with antenna function in higher plants and green algae.** Photochem. Photobiol., 20 : 1187-1206
- Bassi R., Sandona D. et Croce. R. 1997. **Novel aspect of chlorophyll *a/b* binding proteins.** Physiol. Plant., 100: 769-779
- Bellaafiore S., Barneche F., Peltieret G. et Rochaix. J. D. 2005. **State transitions and light adaptation require chloroplast thylakoid protein kinase STN7.** Nature, 433: 892-895.
- Ben-Shem, A., Frolov F. et Nelson N. 2003. **Crystal structure of plant photosystem I.** Nature, 426: 630-635.
- Bernier M et Carpentier R. 1995. **The action of mercury on the binding of the extrinsic polypeptides associated with the water oxidizing complex of photosystem II.** FEBS Lett 360: 251-254.
- Bi Fai, P., Grant, A., Reid, B. 2007. **Chlorophyll *a* fluorescence as a biomarker for rapid toxicity assessment.** Environ. Tox. Chem. 26: 1520-1531.
- Bisova K, Krylov DM, Umen JG. 2005 **Genome-wide annotation and expression profiling of cell cycle regulatory genes in Chlamydomonas reinhardtii.** Plant

Physiol. 137:475-91

Blankenship, R. E. 2002. **Molecular mechanisms of Photosynthesis**. Oxford : Blackwell Science Ltd., pp. 328.

Bowles, G. Ogren W. L and Hageman. R. H. 1971. **Phosphoglycolate production catalyzed by ribulose diphosphate carboxylase**. Biochem. Biophys. Res. Commun., 45: 716-722.

Boyer: D. 1993. **The binding change mechanism for ATP synthase—some probabilities and possibilities**. Biochimica et Biophysica Acta, 1140: 215-250.

Brack, W., Frank, H. 1998. **Chlorophyll *a* fluorescence: A tool for the investigation of toxic effects in the photosynthetic apparatus**. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 40: 34-41.

Buchanan, B. B., Gruissem, W., Jones, R. L. 2000. **Biochemistry & molecular biology of plants**. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland, pp. 1367

Butler, W. L., et Kitajima M. 1975. **A tripartite model for chloroplast fluorescence**. Proceedings, 3rd International Congress on Photosynthesis: 13-24.

Canadian Council of Ministers of the Environment. 1999 **Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life**. No. 1299; ISBN 1-896997-34-1

Chalifour, A., Juneau: 2011. **Temperature-dependent sensitivity of growth and photosynthesis of *Scenedesmus obliquus*, *Navicula pelliculosa* and two strains of *Microcystis aeruginosa* to the herbicide atrazine**. *Aquatic Toxicology* 103: 9-17.

Chalifour, A., Spear, P., Boily, M.H., DeBlois, C., Giroux, I., Dassylva, N., Juneau:

2009. **Assessment of toxic effects of pesticide extracts on different green algal species by using chlorophyll *a* fluorescence.** Toxicology and Environmental Chemistry 91: 1315-1329.
- Chapelka, A. H. et Samuelson L. J. 1998. **Ambient ozone effects on forest trees of the eastern United States, a review.** New Phytol., 139: 91-108.
- Critchley, C. 1998. Photoinhibition. **In Photosynthesis : A comprehensive treatise.** Editor, A. S. Raghavendra. Cambridge University Press, pp. 264-272.
- Critchley, C. 1999. **Molecular adaptation to irradiance : the dual functionality of photosystem II.** In Concepts in Photobiology : Photosynthesis and Photomorphogenesis. Editors, G. S. Singhal. G. Renger, S. K. Sopory, K.-D. Irrgang and Govindjee. New Delhi : Narosa Publishing House, pp. 572-587.
- Dat, J., Vandenabeele E., Vranova M., Montagu V., Inzé D. et Van Breusegem F. 2000. **Dual action of the active oxygen species during plant stress response.** Cellular and Molecular Life Sciences, 57: 779-795.
- De la Torre, W.R., Burkey, K.O. 1992. **Physiological effects of sublethal atrazine on barley chloroplast thylakoid membranes.** Photosynthesis Research 32: 1-10.
- De Las Rivas, J. D., Balsera M. et Barber J. 2004. **Evolution of oxygenic photosynthesis : genome-wide analysis of the OEC extrinsic proteins.** Trends in Plant Science, 9: 18-25.
- Dekker, J. P. et Boekema E. J. 2005. **Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants.** Biochim. Biophys. Acta., 1706: 12-39
- Dekker, J. P. et Van Grondelle R. 2000. **Primary charge separation in photosysteme II.** Photosynth. Res., 63: 195-208

- Demmig-Adams, B., Gilmore A. M. and Adams W. W. III. 1996. **In vivo functions of carotenoids in higher plants.** FASEB Journal. 10: 403-412
- Dewez D, Geoffrey L, Vernet G, Popovic R. 2005 **Determination of photosynthetic and enzymatic biomarkers sensitivity used to evaluate toxic effects of copper ions and fludioxonil in alga *Scenedesmus obliquus*.** Aquat Toxicol 74:150–159
- Dewitte W, Murray J.A. 2003. **The plant cell cycle.** Annu Rev Plant Biol 54:235-264
- Didur O, Perreault F, Oukarroum A, Dewez D, Popovic R. 2012 **Alteration of photosystem II activity by atrazine on *Chlamydomonas reinhardtii* synchronized and asynchronized cell cycle cultures.** Toxicol Environ Chem 94:906-917.
- Diner, B.A., Petrouleas, V. 1987. **Q₄₀₀, the non-heme iron of the photosystem II iron-quinone complex. A spectroscopic probe of quinone and inhibitor binding to the reaction center.** Biochimica & Biophysica Acta 895: 107-125.
- Dorigo, U., Le Boulanger, C. 2001. **A pulse-amplitude modulated fluorescence-based method for assessing the effects of photosystem II herbicides on freshwater periphyton.** Journal of Applied Phycology 13: 509-515.
- Drazkiewicz, M. Skorzynska E. et Krupa. Z. 2004. **Copper induced oxidative stress and antioxidant defence in *Arabidopsis thaliana*.** BioMetals, 17: 379-387.
- Duysens, L. N. M. et Sweers H. E. 1963. **Mechanism of the two photochemical reactions in algae as studied by means of fluorescence. In Studies on microalgae and photosynthetic bacteria.** Editors, L. N. M. Duysens et H. E. Sweers: 353-372. Japanese Society of Plant Physiologists. Tokyo: University of Tokyo Press.

- El Jay, A., Ducruet, J.-M., Duval, J.-C., Pelletier, J.P. 1997. **A high sensitivity chlorophyll fluorescence assay for monitoring herbicide inhibition of photosystem II in the chlorophyte *Selenastrum capricornutum*: Comparison with effect on cell growth.** Archives of Hydrobiology 140: 273-286.
- Eleftheriou EP, Adamakis ID, Melissa P. 2011 **Effects of hexavalent chromium on microtubule organization, ER distribution and callose deposition in root tip cells of *Allium cepa* L.** Protoplasma 249:401-416
- Faller, P., R. J. Debus, K. Brettel, M. Sugiura, A. W. Rutherford et A. Boussac. 2001. **Rapid formation of the stable tyrosyl radical in photosystem II.** Biophysics, 98: 14368-14373.
- Farinas B, Mary C, de O Manes C, Bhaud Y, Peaucellier G and Moreau H. 2006. **Natural synchronisation for the study of cell division in the green unicellular alga *Ostreococcus tauri*.** Plant Molecular Biol 60:277-292
- Fauchot, F. Levasseur, M. Roy, S. Gagnon, R. Weise, A. 2005. **Environmental Factors Controlling *Alexandrium Tamarensis* (*Dinophyceae*) Growth Rate During a Red Tide Event in the St. Lawrence Estuary (CANADA).** J Phycol 41 263-272
- Ferrat, L., C. Pergent-Martini and M. Roméo. 2003. **Assessment of the use of biomarkers in aquatic plants for the evaluation of environmental quality: application to seagrasses.** Aquat. Toxicol., 65: 187-204
- Force, L., C. Critchley et J. J. S. Van Rensen. 2003. **New fluorescence parameters for monitoring photosynthesis in plants.** Photosynthesis Research, 78: 17-33.
- Franco, F., S. Alessandrelli, J. Masojidek, A. Margonelli et M. T. Giardi. 1999.

Modulation of D1 protein turnover under cadmium and heat stresses monitored by [35S]methionine incorporation. Plant Sci., 144: 53-61

Freeman, J., Rayburn, A. 2006. **Aquatic Herbicides and Herbicide Contaminants: In vitro Cytotoxicity and Cell-Cycle Analysis.** Environmental Toxicology 21: 256-263.

Fufezan, C., A. W. Rutherford et A. Krieger-Liszkay. 2002. **Singlet oxygen production in herbicide-treated photosystem II.** FEBS Letters, 532: 407-410.

Garcia-Pintado, J., M. Martinez-Mena, G. G. Barbera, J. Albaladejo et V. M. Castillo. 2007. **Anthropogenic nutrient sources and loads from Mediterranean catchments into a coastal lagoon : Mar menor, Spain.** Sci. Total Environ., 373: 220-239.

Genty B, Briantais JM, Baker NR. 1989 **The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence.** Biochim Biophys Acta 990:87-92

Gérin, M.: Gosselin, C. Viau: Quénel et E. Dewailly. 2003. Environnement et santé publique. Québec, Edisem Inc.: 641-779.

Giardi, M. T., J. Masojidek et D. Godde. 1997. **Effects of abiotic stresses on the turnover of D1 reaction centre II protein.** Physiol. Plant., 101: 635-642.

Giardi, M. T., M. Koblízek and J. Masojidek. 2001. Photosystem II-based biosensors for the detection of pollutants. Biosens. Bioelectron., 16: 1027-1033.

Gonzales-Barreiro, O., C. Rioboo, A. Cid et C. Herrero. 2004. **Atrazine induced clorosis in *Synechococcus elongatus* cells.** Erch. Environ. Contam. Toxicol., 46: 301-307.

- Govindjee et R. Govindjee. 1974. **The absorption of light in photosynthesis.** Sci. American, 231: 64-82.
- Govindjee et W. T. Coleman. 1990. **How plants make oxygen.** Sci. American., 262: 50-58.
- Govindjee, and M. Seufferheld. 2002. **Non-photochemical quenching of chlorophyll a fluorescence : early history and characterization of two xanthophylls-cycle mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*.** Functional Plant Biology, 29: 1141-1155.
- Green, B. R. et D. G. Durnford. 1996. **The chlorophyll-carotenoid proteins of oxigenic photosynthesis.** Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 47: 685-714
- Guasch, H., Sabater, S. 1998. **Light history influences the sensitivity to atrazine in periphytic algae.** Journal of Phycology 34:233-241.
- Guo, W., M. He, Z. Yang, C. Lin, X. Ouan et H. Wang. 2007. **Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in water, suspended particulate matter and sediment from Daliao River watershed, China.** Chemosphere, 68: 93-104.
- Hagiwara SY, Bolige A, Zhang Y, Takahashi M, Yamagishi A, Goto K 2002. **Circadian gating of photoinduction of commitment to cell-cycle transitions in relation to photoperiodic control of cell reproduction in *Euglena*.** Photochem Photobiol 76:105-15
- Hagiwara SY, Bolige A, Zhang Y, Takahashi M, Yamagishi A, Goto K (2002) **Circadian gating of photoinduction of commitment to cell-cycle transitions in relation to photoperiodic control of cell reproduction in**

Euglena. Photochem Photobiol 76:105-15

- Hanikenne M (2003) *Chlamydomonas reinhardtii* as a eukaryotic photosynthetic model for studies of heavy metal homeostasis and tolerance. New Phytologist 159:331–340
- Hansen U.-P., H. Dau, B. Brüning, T. Fritsch and C. Moldaenke. 1991. **Linear analysis applied to the comparative study of the I–D–P phase of chlorophyll fluorescence as induced by actinic PSII light, PSI light and changes in CO₂ concentration.** Photosynth. Res., 28: 119-130.
- Harris EH (1989) **The Chlamydomonas Sourcebook: A comprehensive guide to biology and laboratory use.** San Diego, CA, Academic Press, 780 p.
- Harris, E.H. 1998. Chapter 1: **Introduction to Chlamydomonas.** In *The molecular biology of chloroplasts and mitochondria in Chlamydomonas*, ed. J.-D. Rochaix, M. Goldschmidt-Clermont, S. Merchant, 1-11. Netherlands, Kluwer Academic Publishers.
- Harris, E.H. 2001. *Chlamydomonas* as a model organism. Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology 52: 363-406.
- Haumann, M. et W. Junge. 1999. **Evidence for impaired hydrogen-bonding of tyrosine YZ in calcium-depleted photosystem II.** Biochim. Biophys. Acta, 1411: 121-133.
- Heil WG, Senger H (1986) **Thylakoid-protein phosphorylation during the life cycle of Scenedesmus obliquus in synchronous culture.** Planta 167:233–239
- Heineke, D. 2001. **Photosynthesis : Dark reactions.** In Encyclopedia of Life Sciences. Oxford : Nature Publishing Group, 5 p.

- Heller, R., R. Esnault et C. Lance. 1998. **Physiologie végétale**. 1 Nutrition. Paris : Dunod, pp. 323.
- Heredia: et J. De Las Rivas. 2003. **Calcium dependent conformational change and thermal stability of the isolated PsbO protein detected by FTIR spectroscopy**. *Biochem.*, 42: 11831-11838
- Hiraki, M., van Rensen, J.J.S., Vredenberg, W.J., Wakabayashi, K. 2003. **Characterization of the alterations of the chlorophyll a fluorescence induction curve after addition of Photosystem II inhibiting herbicides**. *Photosynthesis Research* 78:35-46.
- Hollnagel HC, Di Mascio P, Asano CS, Okamoto OK, Stringher CG, Oliveira MC, Colepicolo P. 1996 **The effect of light on the biosynthesis of beta-carotene and superoxide dismutase activity in the photosynthetic alga *Gonyaulax polyedra***. *Braz J Med Biol Res* 29:105-10
- Horcsik ZT, Kovacs L, Laposi R, Meszaros I, Lakatos G, Garab G. 2007 **Effect of chromium on photosystem II in the unicellular green alga, *Chlorella pyrenoidosa***. *Photosynthetica* 45:65-69
- Horton: and A. Hague. 1988. **Studies on the induction of chlorophyll fluorescence in isolated barley protoplasts. IV. Resolution of non-photochemical quenching**. *Biochim. Biophys. Acta*, 932: 107-115
- Horton, P., A. V. Ruban and R. G. Walters. 1996. **Regulation of light harvesting in green plants**. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 47: 655-684.
- Horton, P., A. V. Ruban, and R. G. Walters. 1994. **Regulation of light harvesting in green plants**. *Plant Physiology*, 106: 415-420.
- Hsu, B. D. 1993. **Evidence for the contribution of the S-state transition of oxygen**

- evolution to the initial phase of fluorescence induction.** Photosynth. Res., 36: 81-88.
- Huntley RP, Murray JA. 1999. **The plant cell cycle.** Curr Opin Plant Biol. 6:440-6. Review.
- Ikeda, Y., S. Ohki, K. Koizumi, A. Tanaka, H. Watanabe, H. Kohno, J. J. Van Rensen, P. Boger et K. Wakabayashi. 2003. **Binding site of novel 2-benzylamino-4-methyl-6-trifluoromethyl-1,3,5-triazine herbicides in the D1 protein of photosystem II.** Photosynth. Res., 77: 35-43.
- Jacquet S, Partensky F, Marie D, Casotti R, Vaulot D. 2001 **Cell Cycle Regulation by Light in *Prochlorococcus* Strains.** Appl Environ Microbiol 67:782-790
- Jensen: E., R. Bassi, E. J. Boekema, J. P. Dekker, F. Jansson, D. Leister, C. Robinson and H. V. Scheller. 2007. **Structure, function and regulation of plant photosystem I.** Biochimica et Biophysica Acta, 1767: 335-352.
- Joliot, P., G. Barbieri et R. Chabaud. 1969. **Un nouveau modèle des centres photochimiques du système II.** Photochem. Photobiol., 10: 309-329.
- Jordan, P.: Fromme, H. T. Witt, O. Kuklas, W. Saenger et N. Krauss. 2001. **Threedimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å.** Nature, 411: 909-917.
- Ju, X. T., C. L. Kou: Christie, Z. X. Dou et F. S. Zhang. 2007. **Changes in the soil environment from excessive application of fertilizers and manures to two contrasting intensive cropping systems on the North China Plain.** Environ. Pollut., 145: 497-506.
- Juneau, P., et R. Popovic. 1999. **Evidence for the rapid phytotoxicity and stress evaluation using the PAM fluorometric method : importance and future**

application. *Ecotoxicology*, 8: 449-455

Juneau, P., Qiu, B., Deblois, C.P. 2007. **Use of chlorophyll fluorescence as a tool for determination of herbicide toxic effect: Review.** *Toxicological and Environmental Chemistry* 89: 609-625.

Jupin, H. et A. Lamant. 1999. **La photosynthèse.** Paris : Dunod, pp. 268.

Jursinic, P., Stemler, A. 1983. **Changes in [^{14}C] atrazine binding associated with the oxidation-reduction state of the secondary quinone acceptor of photosystem II.** *Plant Physiology* 73:703:708.

Kaftan D, Meszaros T, Whitmarsh J, and Nedbal L. 1999 **Characterization of Photosystem II Activity and Heterogeneity during the Cell Cycle of the Green Alga *Scenedesmus quadricauda***1. *Plant Physiol* 120:433–441

Kalita TL, Titlyanova TV, Titlyanov EA. 2007 **New Rhythmic Changes in Mitosis and Growth in Low Differentiated Green and Red Marine Macroalgae.** *Russ J Mar Biol* 33:207–212

Kanervo, E., M. Suorsa et E. M. Aro. 2005. **Functional flexibility and acclimation of the thylakoid membrane.** *Photochem. Photobiol. Sci.*, 4: 1072-1080.

Kautsky, H., et A. Hirsch. 1931. **Neue Versuche zur kohlenensäureassimilation.** *Naturwissenschaften*, 19: 964.

Khrouchtchova, A., M. Hansson, V. Paakkarinen, J. P. Vainonen, S. P. Zhang: E. Jensen, H. V. Scheller, A. V. Vener, E. M. Aro et . Haldrup. 2005. **A previously found thylakoid membrane protein of 14 kDa (TMP14) is a novel subunit of plant photosystem I and is designated PSI-P.** *FEBS Letters*, 579: 4808-4812.

- Kitajima M, Butler WL (1975) **Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone.** Biochim Biophys Acta 376:105-115
- Knoetzel, J., A. Mant, A. Haldrup: E. Jensen et H. V. Scheller. 2002. **A new 10-kDa subunit of eukaryotic photosystem I.** FEBS Letters, 510: 145-148.
- Kok, B., B. Forbush et M. Mc Gloin. 1970. **Cooperation of charges in photosynthetic O₂ evolution. I. A linear four steps mechanism.** Photochem. Photobiol. 11: 457-475.
- Kramer, D. M., G. Johnson, O. Kiirats et G. E. Edwards. 2004. **New fluorescence parameters for the determination of QA redox state and excitation energy fluxes.** Photosynthesis Research, 79: 209-218.
- Krause, G.H., and P. Jahns. 2004. **Non-photochemical energy dissipation determined by chlorophyll fluorescence quenching: characterization and function. In Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis,** Editors, G. C. Papageorgious and Govindjee, pp 463-495. Springer, The Netherlands.
- Kruger-Liszka, A. et A. W. Rutherford. 1998. **Influence of herbicide binding on the redox potential of the quinine acceptor in photosystem II : relevance to photodamage and phytotoxicity.** Biochemistry, 37: 17339-17344.
- Kukarskikh, G. L., E. E. Graevskaia, T. E. Krendeleva, K. N. Timofeeva et A. B. Rubin. 2003. **Effect of methylmercury on primary photosynthesis processes in green microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*.** Biofizika, 48: 853-859.
- Labra M, Bernasconi M, Grassi F, De Mattia F, Sgorbati S, Airolidi R, Citterio S. 2007

Toxic and genotoxic effects of potassium dichromate in *Pseudokirchneriella subcapitata* detected by microscopy and AFLP marker analysis. *Aquat Bot* 86:229-235

Lambrev, P., Ivanov, S., Goltsev, V. 2003. **Effects of prolonged action of sub-herbicide concentrations of atrazine on the photosynthetic function of pea plants.** *Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences* 56:59-62.

Lazár, D. 1999. **Chlorophyll a fluorescence induction.** *Biochimica et Biophysica Acta*, 1412: 1-28.

Lazár, D. 2006. **The polyphasic chlorophyll a fluorescence rise measured under high intensity of exciting light.** *Funct. Plant Biol.*, 33: 9-30.

Lehninger, A. L., D. L. Nelson et M. M. Cox. 1994. **Principes de biochimie.** 2^{ème} édition. Paris : Médecine-Sciences Flammarion, 1120 p.

Lichtenthaler HK. 1987 **Chlorophylls and caretonoids: pigments of photosynthetic biomembranes.** In : Packer L, Douce R, *Methods in enzymology*, Vol 148. Academic Press, London, p 350-382.

Lichtenthaler, H.K. 1987. **Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes.** *Methods in Enzymology* 148: 350-382.

Lu, C. M., C. W. Chau et J. H. Zhang. 2000. **Acute toxicity of excess mercury on the photosynthetic performance of cyanobacterium *S. platensis* assessment by chlorophyll fluorescence analysis.** *Chemosphere*, 41: 191-196.

Macinnis-Ng, C.M.O., Ralph, P.J. 2003. **Short-term response and recovery of *Zostera capricorni* photosynthesis after herbicide exposure.** *Aquatic Botany* 76:1-15.

- Magnusson, M., Heimann, K., Negri, A.P. 2008. **Comparative effects of herbicides on photosynthesis and growth of tropical estuarine microalgae.** Marine Pollution Bulletin 56:1545:1552.
- Maksymiec, W. 1997. **Effect of copper in higher plants.** Photosynthetica, 34: 321-342.
- Malkin, R. et Niyogi, K. 2000. **Biochemistry and molecular biology of plants.** Buchanan, B., Gruissem, W. et Jones, R. (Eds). American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, USA, pp. 568-628.
- Mallick N, Mohn FH (2003) **Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress research: a case study with the green microalga *Scenedesmus*.** Ecotox Environ Saf 55:64–69
- Martin, W., R. Scheibe et C. Schnarrenberger. 2000. **The Calvin cycle and its regulation. In Photosynthesis : physiology and metabolism.** Editors, R. C. Leegood, T. D. Sharkey et S. Von Caemmerer. Dordrecht : Kluwer Academic Publishers, pp. 9-51
- McAteer, M., Donnan, L. and John: (1985) **The timing of division in *Chlamydomonas*.** New Phytol. 99: 41–56.
- McKersie, B. D. et Y. Y. Leshem. 1994. **Oxidative stress.** In Stress and stress coping in cultivated plants. Editors, B. D. McKersie et Y. Y. Leshem, Dordrecht, Pays-Bas : Kluwer Academic Publishers: 15-54
- Miller, K. 1979. **La membrane photosynthétique.** Pour la Science, 26: 27-39.
- Mills, P.K. 1998. **Correlation analysis of herbicide use data and cancer incidence rates in California counties.** Archives of Environmental Health 53: 410-413.

- Mitchell: 1974. **A chemiosmotic molecular mechanism for proton-translocating adenosine triphosphatases.** FEBS Letters, 43: 189-194.
- Miyao, M., N. Murata. 1984. **Role of the 33-kDa polypeptide in preserving Mn in the photosynthetic oxygen-evolving system and its replacement by chloride ions.** FEBS Lett., 170: 350-354.
- Mohanty P, Allakhverdiev SI, Murata N. 2007 **Application of low temperatures during photoinhibition allows characterization of individual steps in photodamage and the repair of photosystem II.** Photosynth Res 94:217-224
- Moriyama T, Terasawa K, Sekine K, Toyoshima M, Koike M, Fujiwara M, Sato N. 2010 **Characterization of cell-cycle-driven and light driven gene expression in a synchronous culture system in the unicellular rhodophyte *Cyanidioschyzon merolae*.** Microbiology 156:1730–1737
- Moronsito, T., S. Caffari, L. Dall'Osto et R. Bassi. 2003. **Mechanistic aspect of the xanthophyll dynamics in higher plant thylakoids.** Physiol. Plant., 119: 347-354.
- Müller, P., X.: Li, et K. K. Niyogi. 2000. **Non-photochemical quenching. A response to excess light energy.** Plant Physiol., 125: 1558-1566.
- Murthy, S.D., N. Mohanty et P. Mohanty. 1995. **Prolonged incubation with low concentrations of mercury alters energy transfert and chlorophyll (Chl) a protein complexes in *Synechococcus* 6301: changes in Chl a absorption and emission characteristics and loss of the F695 emission band.** Biometals, 8: 237-242.
- Mustárdy, L. et G. Garab. 2003. Granum revisited. **A three dimensional model**

where things fall into place. Trends Plant Science, 8: 117-122.

- Mysliwa-Kurdziel, B. et K. Strzalka. 2005. **Influence of Cd(II), Cr(VI) and Fe(III) on early steps of deetiolation process in wheat : fluorescence spectral changes of protochlorophyllide and newly formed chlorophyllide.** Agriculture, Ecosystems and Environment, : 106 : 199-207.
- Nakajima, Y., S. Yoshida et T. A. Ono. 1996. **Differential of urea/triazine-type and phenol-type photosystem II inhibitors on inactivation of the electron transport and degradation of D1 protein during photoinhibition.** Plant Cell Physiol., 37: 673-680
- Nelson, N. et A. Ben-Shem. 2004. **The complex architecture of oxygenic photosynthesis.** Mol. Cell Biol. 5: 1-12.
- Neubauer, C., et U. Schreiber. 1987. **The polyphasic rise of chlorophyll fluorescence upon onset of strong continuous illumination : I. Saturation characteristics and partial control by the photosystem II acceptor side.** Zeitschrift für Naturforschung, 42: 1246-1254.
- Nguyen-Ngoc, H., Durrieu, C., Tran-Minh, C. 2009. **Synchronous-scan fluorescence of algal cells for toxicity assessment of heavy metals and herbicides.** Ecotoxicology and Environmental Safety 72: 316-320.
- Nishiyama, Y., S.I. Allakhverdiev et N. Murata. 2006. **New paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II.** Biochimica et Biophysica Acta, 1757: 742-749.
- Nitschke, L., A. Wilk, W. Schüssler, G. Metzner and G. Lind. 1999. **Biodegradation in laboratory activated sludge plants and aquatic toxicity of herbicides.** Chemosphere, 39: 2313-2323

- Niyogi, K. K., X.-P. Li, V. Rosenburg et H.-S. Jung. 2004. **Is PsbS the site of nonphotochemical quenching in photosynthesis?**. Journal of Experimental Botany, 56: 375-382.
- Oquist, G., and N. P. A. Huner. 1993. **Cold-hardening-induced resistance to photoinhibition of photosynthesis in winter rye dependent upon an increased capacity for photosynthesis.** Planta, 189: 150-156.
- Ort, D. R. 1986. **Energy transduction in oxygenic photosynthesis : an overview of structure and mechanism.** In Bioenergetics of photosynthesis. Editor, Govindjee. New York : Academic Press, pp. 319-371
- Owens, T. G. 1996. **Processing of excitation energy by antenna pigments. In Photosynthesis and the environment.** Editor, N. R. Baker NR: 1-23. Kluwer Academic, The Netherlands.
- Pagliano, C., M. Raviolo, F. D. Vecchia, R. Gabbrielli, C. Gonnelli, N. Rascio, R. Barbato et N. La Rocca. 2006. **Evidence for PSII-side damage and photoinhibition induced by cadmium treatment on rice (*Oryza sativa* L.).** J. Photochem. Photobiol. B : Biol., 84: 70-78
- Pandey, V., V. Dixit et R. Shyam. 2005. **Antioxidative responses in relation to growth of mustard (*Brassica juncea* cv. Pusa Jaikisan) plants exposed to hexavalent chromium.** Chemosphere, 61: 40-47.
- Papageorgiou, G. 1975. Bioenergetics of photosynthesis. Govindjee (Ed). Academic Press Inc., New York, NY, USA: 319-371.
- Parkhill, J P. Cembella, A D. 1999. **Effects of Salinity, Light and Inorganic Nitrogen on Growth and Toxigenicity of the Marine Dinoflagellate *Alexandrium Tamarense* from Northeastern Canada.** J Plankton R 21

939-955.

- Pätsikkä, E., M. Kairavuo, F. Sersen, E. M. Aro and E. Tyystjarvi. 2002. **Excess copper predispose photosystem II to photoinhibition in vitro by out competing iron and causing decrease in leaf chlorophyll.** Plant Physiology, 129: 1359-1367.
- Perreault F, Ait Ali N, Saison C, Popovic R, Juneau P 2009 **Dichromate effect on energy dissipation of photosystem II and photosystem I in *Chlamydomonas reinhardtii*.** J Photochem Photobiol B 96:24-29
- Perreault F, Ait Ali N, Saison C, Popovic R, Juneau P 2009. **Dichromate effect on energy dissipation of photosystem II and photosystem I in *Chlamydomonas reinhardtii*.** J Photochem Photobiol B. 96: 24-29.
- Plekhanov, S. E. et Yu K. Chemeris. 2003. **Early toxic effects of zinc, cobalt and cadmium on photosynthetic activity of the green alga *Chlorella pyrenoidosa* Chick S-39.** Ecology, 30: 610-616.
- Polle, J., Melis, A. 1999. **Recovery of the photosynthetic apparatus from photoinhibition during dark incubation of the green alga *Dunaliella salina*.** Australian Journal of Plant Physiology 26: 679-686.
- Popelkova, H., S. D. Betts, N. Lydakis-Symantiris, M. M. Im, E. Swenson et C. F. Yocum. 2006. **Mutagenesis of basic residues R151 and R161 in manganese-stabilizing protein of photosystem II causes inefficient binding of chloride to the oxygen evolving complex.** Biochem., 45: 3107-3115.
- Poulson, M., G. Samson et J. Whitmarsh. 1995. **Evidence that cytochrome b559 protects photosystem II against photoinhibition.** Biochemistry, 34: 10932-

10938.

Powell, E., Faldladdin, N., Rand, A., Pelzer, D., Schrunk, E., Dhanwada, K. 2011. **Atrazine exposure leads to altered growth of HepG2 cells.** *Toxicology in Vitro* 25: 644-651.

Prasad, M. N. V., et K. J. Dietz. 1999. **Heavy metals stress in plants. In Free radical and reactive oxygen species as mediator of heavy metal.** Editor, B. Heidelberg, Elsevier, pp. 73-97.

Rachid, A., E. L. Camm et A. K. M. Ekramoddoullah. 1994. **Molecular mechanism of action of Pb^{2+} and Zn^{2+} on water oxidizing complex of photosystem II.** *FEBS Letters*, 350: 296-298.

Raines, C. 2003. **The Calvin cycle revisited.** *Photosynthesis Research*, 75: 1-10.

Ralph, P.J. 2000. **Herbicide toxicity of *Halophila ovalis* assessed by chlorophyll a fluorescence.** *Aquatic Botany* 66:141-152.

Raven, H., Evert R. et Eichhnorn, S. E. 2000. **Photosynthèse, lumière et vie. In Biologie végétale.** De Boeck Université, Paris. p. 126-152.

Rea, G., Polticelli, F., Antonacci, A. Scognamiglio, V. Katiyar, P., Kularni, S., Johanningmeier, U., Giardi, M.T. (2009). **Structur-based design of novel *Chlamydomonas reinhartii* D1-D2 photosynthetic proteins for herbicide monitoring.** *Protein Sci.* 18: 2139-2151

Rockholm, D. C. and H. Y. Yamamoto. 1996. **Violaxanthin de-epoxidase.** *Plant Physiol.*, 110: 697-703.

Rodriguez MC, Barsanti L, Passarelli V, Evangelista V, Conforti V, Gualtieri P. 2007 **Effects of chromium on photosynthetic and photoreceptive apparatus of**

the alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Environ Res 105:234-239

- Rohacek, K. 2002. **Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships.** Photosynthetica, 40: 13-29.
- Rohacek, K. and M. Bartak. 1999. **Technique of the modulated chlorophyll fluorescence : basic concepts, useful parameters, and some applications.** Photosynthetica, 37: 339-363.
- Rohacek, K., Bartak, M. 1999. **Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: basic concepts, useful parameters, and some applications.** Photosynthetica 37: 339-363.
- Roose J L, Kimberly J L, Wegener A, Pakrasi H.B 2007. **The Extrinsic Proteins of Photosystem II.** Photosynth Res 92 369–387
- Rutherford, A. W. et Krieger-Liszkay A 2001. **Herbicide-induced oxidative stress in photosystem II.** Trends in Biochem. Sci., 26: 648-653.
- Saha R, Nandi R, Saha B (2011) **Sources and toxicity of hexavalent chromium.** J Coord Chem 64:1782-1806
- Schmid, V. H. R.: Potthast, M. Wiener, V. Bergauer, H. Paulsen et S. Storf. 2002. **Pigment binding of photosystem I light-harvesting proteins.** Journal of Biological Chemistry, 277: 37307-37314.
- Schreiber, U. 2004. **Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) fluorimetry and saturation pulse method : An overview. In Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis.** Editors, G. C., Papageorgiou and Govindjee. Dordrecht : Springer, pp. 279-319.

- Schreiber, U., U. Schliwa et W. Bilger. 1986. **Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer.** Photosynthesis Research, 10: 51-62.
- Seidler, A. 1996. **The extrinsic polypeptides of photosystem II.** Biochem. Biophys. Acta, 1277: 35-60
- Sersen, F. et K. Kralova. 2001. **New facts about CdCl₂ action on the photosynthetic apparatus of spinach chloroplasts and its comparison with HgCl₂ action.** Photosynthetica., 39: 575-580.
- Shutova, T., J. Nikitina, G. Deikus, B. Andersson, V. Klimov et G. Samuelsson. 2005. **Structural dynamics of the manganese stabilizing protein-effect of pH, calcium and manganese.** Biochem., 44: 15182-15192.
- Sigfridsson SK G V, Bernat G, Mamedov F et Styring . 2004. **Molecular interference of Cd²⁺ with photosystem II.** Biochim. Biophys. Acta, 1659: 19-31.
- Singh, M., K. S. Reddy, V. P. Singh et T. R. Rupa. 2007. **Phosphorus availability to rice (*Oriza sativa* L.) wheat (*Triticum aestivum* L.) in a Vertisol after eight years of inorganic and organic fertilizer additions.** Bioresour Technol., v. 98: 1474-1481.
- Smeets, K., A. Cuypers, A. Lambrechts, B. Semane: Hoet, A. Van Laere et J. Vangronsveld. 2005. **Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in *Phaseolus vulgaris* after Cd application.** Plant Physiol. Biochem., 43: 437-444.
- Sprovieri, M., M. L. Feo, L. Prevedello, D. S. Manta, S. Sammartino, S. Tamburrino,

- E. Marsella. 2007. **Heavy metals, polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in surface sediments of Naples harbour (southern Italy).** Chemosphere, v. 67: 998-1009.
- Spudich J and Sager R (1980) **Regulation of the *Chlamydomonas* cell cycle by light and dark.** J Cell Biol 85:136-145
- Stiborová, M., M. Doubravová, A. Brezinová and A. Friedrich. 1986. **Effect of heavy metal ions on growth and biochemical characteristics of photosynthesis of barley *Hordeum vulgare* L.** Photosynthetica, 20: 418-425.
- Strasser BJ, Strasser RJ. 1995 **Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: the JIP-test.** In: Mathis P (ed) Photosynthesis: from light to biosphere, V. Kluwer Academic Publishers, pp 977-980
- Strasser B.J. 1999. **Donor side capacity of Photosystem II probed by chlorophyll a fluorescence transients.** Photosynth Res 52:147-155
- Strasser BJ, Dau H, Heinze I, Senger H. 1999 **Comparison of light induced and cell cycle dependent changes in the photosynthetic apparatus: A fluorescence induction study on the green alga *Scenedesmus obliquus*.** Photosynth Res 60: 217-227
- Strasser, R. J., et Govindjee. 1991. **The Fo and O-J-I-P fluorescence rise in higher plants and algae. Dans Regulation of chloroplast biogenesis.** Editor, J. H Argyroudi-Akoyunoglou: 423-426. New York : Plenum Press.
- Strasser RJ, Srivastava A, Govindjee. 1995 **Polyphasic Chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyanobacteria.** Photochem Photobiol 61:32-42
- Strasser, B.J., Strasser, R.J. 1995. **Chlorophyll a fluorescence: a signature of pho-**

- tosynthesis.** in Photosynthesis: From light to Biosphere, ed. P. Mathis, 977-980. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.
- Strasser, R. J. 1997. **Donor side capacity of photosystem II probed by chlorophyll a fluorescence transients.** Photosynthesis Research, 52: 147-155.
- Strasser, R.J., Srivastava, A., Tsimilli-Michael, M. 2000. **The fluorescence transient as a tool to characterise and screen photosynthetic samples.** In Probing Photosynthesis: Mechanism, Regulation and Adaptation, eds M. Yunus, U. Pathre: Mohanty, 445-483. Bristol, Taylor & Francis.
- Strasser, R.J., A. Srivastava et M. Tsimilli-Michael. 2004. **Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient.** In **Chlorophyll Fluorescence a Signature of Photosynthesis, Advances in Photosynthesis and respiration.** Editors G. Papageorgiou, Govindjee. 19, pp. 321-362. The Netherlands : Kluwer Academic Publishers.
- Stroch, M., V. Spunda et I. Kurasova. 2004. **Non-radiative dissipation of absorbed excitation energy within photosynthetic apparatus of higher plants.** Photosynthetica, 42: 323-337.
- Suorsa, M. et E. M. Aro. 2007. **Expression, assembly and auxiliary functions of photosystem II oxygen-evolving proteins in higher plants.** Photosynth. Res. In press.
- Sušila, P., D. Lazár: Ilík: Tomek and J. Nauš. 2004. **The gradient of exciting radiation within a sample affects relative heights of steps in the fast chlorophyll a fluorescence rise.** Photosynthetica, 42: 161-172.
- Suzuki K, Ehara T, Osafune T, Kuroiwa H, Kawano S, Kuroiwa T. 1994 **Behavior of mitochondria, chloroplasts and their nuclei during the mitotic cycle in**

- the ultramicroalga *Cyanidioschyzon merolae*. Eur J Cell Biol 63:280-288.
- Swaminathan P, Venugopal R, Mallayan P, Lakshmanan U. 2009 **Chromium-induced in vivo DNA changes in marine algae *Oscillatoria willei* BDU 130511 (Cyanophyta)**. Int J Algae 11:395-402
- Szabo, I., E. Bergantino et G. M. Giacometi. 2005. **Light and oxygenic photosynthesis : energy dissipation as a protection mechanism against photo-oxydation**. EMBO Report, 6: 629-634
- Szivak I, Behra R, Sigg L .2009 **Metal-induced reactive oxygen species production in *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae)**. J Phycol 45:427-435
- Tang, J.-X., Hoagland, K.D., Siegfried, B.D. 1997. **Differential Toxicity of Atrazine to Selected Freshwater Algae**. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 59: 631-637.
- Thompson, D. G., K. R. Solomon, B. F. Wojtaszek, A. N. Edginton et G. R. Stephenson. 2006. **The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities**. Appl. Ecol., 16: 2022-2027.
- Thornber, J. P., D. T. Morishige, S. Anadan, et G. F. Peter. 1991. **Chlorophyll-carotenoid proteins of higher plant thylakoids**. In Chlorophylls. Editor, H. Scheer. Londres : CRC Press, pp. 549-585.
- Van der Heever, J.A., Groggelaar, J.U. 1998. ***In vivo* chlorophyll a fluorescence of *Selenastrum capricornutum* as a screening bioassay in toxicity studies**. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 35: 281-286.
- Van Dolah, F. Lidie, K. Monroe, E. Kamykowski, D. 2009. **The Florida Red Tide Dinoflagellate *Karenia Brevis*: New insights into Cellular and Molecular**

Processes Underlying Bloom Dynamics. J Hal 8 562-572

- Vandepoele K., Raes J, De Veylder L, Rouze P, Rombauts S and Inze D. 2002. **Genome-wide analysis of core cell cycle genes in *Arabidopsis*.** Plant Cell 14: 903–916
- Vítová, M., Bišová, K., Umysová, D., Hlavová, M., Kawano, S., Zachleder, V., Čížková, M. 2011. ***Chlamydomonas reinhardtii*: duration of its cell cycle and phases at growth rates affected by light intensity.** Planta 233: 75-86.
- Wade, M. J., B. K. Davis, J. S. Carlisle, A. K. Klein et L. M. Valoppi. 1993. **Environmental transformation of toxic metals.** Occup. Med., 8: 575-601.
- Wahid, A. 2006. **Influence of atmospheric pollutants on agriculture in developing countries : a case study with three new wheat varieties in Pakistan.** Sci. Total Environ., 371: 304-313.
- Walker, C. H., S. P. Hopkin, R. M. Sibly et D. B. Peakall. 1996. **Principles of ecotoxicology.** Taylor and Francis Inc., Bristol, USA, 321 pp.
- Weise, A.M. Levasseur, M. Saucier, F.J. Senneville, S. Bonneau, E. Roy, S. Sauvé, G. Michaud, S. Fauchot, J. 2002. **The Link Between Precipitation, River Runoff, and Blooms of the Toxic Dinoflagellate *Alexandrium Tamarense* in the St. Lawrence.** Can. J. Fish. Aquat. Sci. 59 464–473
- Whitmarsh, J. 1998. **Electron transport and energy transduction. Photosynthesis: A Comprehensive Treatise.** Editors, A. S. Raghavendra: 87–107. Cambridge University Press, Cambridge.
- Whitmarsh, J. and Govindjee. 2002. **Photosystem II.** Encyclopedia of Life Sciences. Oxford : Nature Publishing Group, 13 p.

- Wincencjusz, H., C. F. Yocum et H. J. Van Gorkom. 1999. **Activating anions that replace Cl⁻ in the O₂-evolving complex of photosystem II slow the kinetics of the terminal step in water oxidation and destabilize the S₂ and S₃ states.** *Biochem.*, 38: 3719-3725.
- Yee M.C. and Bartholomew J.C. 1988. **Light regulation of the cell cycle in *Euglena gracilis bacillaris*.** *Cytometry* 9:387-393.
- Yi, X., M. McChargue, S. Laborde, L. K. Frankel et T. M. Bricker. 2005. **The manganese-stabilizing protein is required for photosystem II assembly/stability and photoautotrophy in higher plants.** *The Journal of Biol. Chem.*, 280: 16170-16174.
- Zayed AM, Terry M. 2003 **Chromium in the environment: factors affecting biological remediation.** *Plant Soil* 249:139-156
- Zrýd, J. P., M. Lanoz, F. Rachidi et P. Zweiacker. 2002. **Influence of HF electromagnetic fields on the development and the molecular biology of the moss *Physcomitrella patens* and the nematode *Caenorhabditis elegans*.** 14th International Symposium on Electromagnetic Compatibility, Proceedings Supplement: 179-180.